UNTERSUCHUNGEN ZUR STOFFWECHSELWIRKUNG VON GLUCAGON AUF LEBERMITOCHONDRIEN

Malak Fahimi-Hamidi

Diss
München

UNTERSUCHUNGEN ZUR STOFFWECHSELWIRKUNG VON GLUCAGON AUF LEBERMITOCHONDRIEN

Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Malak Fahimi-Hamidi
aus Teheran

München 1984

1. Berichterstatter: Prof. Dr. O.H. Wieland

2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann

Abgabe der Arbeit: 1. Februar 1984

Mündliche Prüfung: 2. April 1984

Die Durchführung dieser Arbeit wurde mir in großzügiger Weise von Herrn Prof. Dr. O. Wieland, Leiter des Instituts für Diabetesforschung, ermöglicht. Für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für sein stetes Interesse an dieser Arbeit und für das in mich gesetzte Vertrauen möchte ich mich aufrichtig bedanken.

Besonders danken möchte ich meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. G. Hartmann für die wertvollen Ratschläge, die er jederzeit mir und meiner Arbeit zuteil werden ließ.

Mein großer Dank gilt Herrn Dr. E. Siess für seine umfassende Anleitung und Unterstützung in experimentellen und theoretischen Fragen, sowie für die zahlreichen Diskussionen, die entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An dieser Stelle möchte ich auch Herrn Dr. F. Machicao sehr herzlich für seine Unterstützung bei der Lösung praktischer Aufgaben danken.

Mein Dank gilt ebenfalls den Assistentinnen der Arbeitsgruppe Siess für ihre freundliche Hilfsbereitschaft.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534920_0035

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
II.	EXPERIMENTELLER TEIL	4
1.	Materialien	4
1.1.	Geräte	4
1.2.	Chemikalien	6
1.2.1	Anorganische und organische Chemikalien	6
1.2.2.	Biochemikalien	7
1.2.3.	Radiochemikalien	8
1.3.	Versuchstiere	8
2.	Methoden	9
2.1.	Isolierung von Succinyl-CoA-Transferase aus Schafsnieren	9
2.2.	Herstellung von Reagenzien	13
2.2.1.	Krebs-Henseleit-Puffer	13
2.2.2.	Medium zur Isolation von Mitochondrien	13
2.2.3.	Herstellung der Szintillationsflüssigkeit	13
2.2.4.	Herstellung von Acetoacetyl-CoA	14
2.2.5.	Herstellung des fettfreien Albumins	14
2.2.6.	Atmungsmedium	14
2.3.	Glucagon-Behandlung von Ratten	15
2.4.	Herstellung des Leberextraktes	15

2.5.	Präparation isolierter Mitochondrien aus Rattenleber	16
2.6.	Inkubation isolierter Mitochondrien	16
2.6.1.	Ansatz für Status 3 durch Zusatz von ADP	17
2.6.2.	Ansatz für Status 3 durch ADP-regenerierendes System	17
2.6.3.	Trennung isolierter Mitochondrien vom Inkubationsansatz	18
2.7.	Präparation isolierter Hepatozyten	18
2.8.	Inkubation der Hepatozyten	19
2.9.	Aktivitätsbestimmung der δ-Amino-laevulinsäure-Synthetase	20
2.10.	Aktivitätsbestimmung der Entkoppler-abhängigen ATPase	21
2.11.	Aktivitätsbestimmung der Glutamat-Dehydrogenase	21
2.12.	Aktivitätsbestimmung der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase	21
2.13.	Aktivitätsbestimmung der Pyruvat-Carboxylase	22
2.14.	Aktivitätsbestimmung der Succinat-Dehydrogenase	22
2.15.	Aktivitätsbestimmung der Succinyl-CoA-Synthetase	22
2.16.	Aktivitätsbestimmung der Succinyl-CoA-Transferase	23

2.17.	Acetoacetyl-CoA-Bestimmung	24
2.18.	Adenosindiphosphat-Bestimmung	24
2.19.	Adenosintriphosphat-Bestimmung	24
2.20.	Citrullin-Bestimmung	25
2.21.	Glutamat-Bestimmung	25
2.22.	Malat-Bestimmung	25
2.23.	2-Oxoglutarat-Bestimmung	26
2.24.	Phosphat-Bestimmung	26
2.25.	Phosphoenolpyruvat-Bestimmung	27
2.26.	Succinyl-CoA-Bestimmung	27
2.27.	Proteinbestimmung	27
2.28.	Berechnung der Metabolitkonzentrationen	28
III.	ERGEBNISSE	29
1.	Einfluß von Glucagon auf den hepatischen Succinyl-CoA-Gehalt	29
1.1.	Succinyl-CoA-Gehalt gefriergestoppter Leber	29
1.2.	Succinyl-CoA-Gehalt isolierter Hepatozyten	31
2.	Wirkung von Glucagon auf die Aktivität der Succinyl-CoA-Transferase	34
3.	Wirkung von Glucagon auf die Aktivität der Succinyl-CoA-Synthetase	36
3.1.	Wirkung von Glucagon auf die Aktivität der Succinyl-CoA-Synthetase in mitochondrialen Extrakten	36

3.2.	Wirkung von Dibutyryl-cAMP auf die Aktivität der Succinyl-CoA-Synthetase in Zellextrakten	37
3.3.	Mögliche Effektoren der Succinyl-CoA-Synthetase	38
4.	Wirkung von Glucagon auf die Aktivität der δ-Aminolaevulinsäure-Synthetase	40
4.1.	Aktivitätsbestimmung der δ-Aminolaevulinsäure-Synthetase im Leberhomogenat	40
4.1.1.	Aktivitätsbestimmung nach Ebert	40
4.1.2.	Aktivitätsbestimmung nach Sassa	45
4.2.	Aktivitätsbestimmung der δ-Aminolaevulinsäure-Synthetase in isolierten Hepatozyten	49
4.3.	Wirkung von Glucagon auf die Aktivität der δ-Aminolaevulinsäure-Synthetase im Leberhomogenat	50
4.4.	Wirkung von Glucagon auf die Aktivität der δ-Aminolaevulinsäure-Synthetase in isolierten Mitochondrien	51
5.	Wirkung von anorganischem Phosphat auf den Mitochondrienstoffwechsel	52
5.1.	Wirkung von anorganischem Phosphat auf Metabolitgehalte isolierter Mitochondrien im Status 3	52
5.1.1.	Einstellung von Status 3 durch Zusatz von ADP	52

5.1.2.	Einstellung von Status 3 durch ein ADP-regenerierendes System	54
5.2.	Phosphat-Wirkung in Gegenwart von Ruthenium-Rot	57
5.3.	Phosphat-Wirkung auf die Citrullin-Bildung	59
6.	Stabilisierende Wirkung von Glucagon auf mitochondriale Funktionen	60
6.1.	Einfluß des Isolationsmediums auf den Glucagon-Effekt	60
6.2.	Einfluß der Mitochondrienwaschung auf den Glucagon-Effekt	62
6.3.	Einfluß der Mitochondrienaufbewahrung auf den Glucagon-Effekt	64
6.4.	Einfluß der Testtemperatur auf den Glucagon-Effekt	68
IV.	DISKUSSION	69
V.	ZUSAMMENFASSUNG	86
VI.	ABKÜRZUNGEN	88
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	89
	LEBENSLAUF	95

I. EINLEITUNG

Glucagon, ein Peptidhormon aus 29 Aminosäuren, wird in den Alpha-Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas gebildet. Als Gegenspieler des Insulins sorgt es für die Bereitstellung von Glucose im Blut. Dies geschieht durch die Stimulierung der Glycogenolyse (Sutherland & Cori,1957) und der Gluconeogenese (Schimassek & Mitzkat, 1963) in der Leber. Weitere hepatische Wirkungen des Glucagons umfassen eine gesteigerte Proteolyse und Lipolyse, die zur Erhöhung der Harnstoff- und Ketonkörperbildung führen (Struck et al., 1965).

Obwohl die Stimulierung der Gluconeogenese durch Glucagon seit etwa 20 Jahren bekannt ist (Schimassek & Mitzkat, 1963 ; Struck et al., 1965), blieb der Mechanismus dieser Wirkung ungeklärt. Aufgrund zahlreicher Untersuchungen wurde als Ort der cAMP-abhängigen Hormonwirkung eine Stelle zwischen Pyruvat und Phosphoenolpyruvat vorgeschlagen (Williamson et al., 1969 ; Exton & Park, 1969).

Die Suche nach dem Wirkungsort des Glucagons erhielt mit der Einführung der isolierten Hepatozyten nach Berry & Friend (1969) einen neuen Impuls; denn dadurch wurde es möglich, Einblick in die Verteilung der Metabolite auf den cytosolischen und mitochondrialen Raum einer Zelle zu gewinnen. Durch die Anwendung der Kompartimentierungstechnik von Zuurendonk & Tager (1974) gelang es erstmals, die durch Glucagon hervorgerufenen Veränderungen der subzellulären Metabolitverteilung zu studieren (Siess et al., 1977 , 1978b).

Dabei zeigte sich als Ausdruck gesteigerter Pyruvat-Carboxylierung ein Anstieg des Malats und Aspartats im cytosolischen Kompartiment, eine Erhöhung des ATP- und Acetyl-CoA-Gehalts im mitochondrialen Matrixraum und eine Vermehrung des Phosphoenolpyruvats in beiden Kompartimenten (Siess et al., 1977).

Die quantitativ auffälligste Veränderung betraf jedoch die Abnahme von Glutamat und 2-Oxoglutarat, die in beiden Kompartimenten fast 80% betrug (Siess et al., 1977). Damit wurde die Beobachtung von Ui et al. (1973) an perfundierter Rattenleber bestätigt und erweitert und auf die Beschleunigung des 2-Oxoglutarat-Abbaus im Rahmen des Citrat-Zyklus als möglichen Angriffspunkt des Glucagons hingewiesen.

Mit der Entdeckung von Fructose-2,6-Bisphosphat durch van Schaftingen et al. (1980a,b) wurde ein bedeutender Fortschritt in der Aufklärung der cytosolischen Glucagon-Wirkung erzielt. Die Erkenntnis, daß Glucagon die Konzentration von Fructose-2,6-Bisphosphat, dem positiven Effektor der Phosphofructokinase, herabsetzt (van Schaftingen et al., 1980a,b), machte die Hemmung der Glycolyse durch Glucagon auf der Stufe der Phosphofructokinase verständlich. Die Abnahme der C_5-Dicarbonsäuren konnte aber damit nicht erklärt werden. Deshalb ist der erste Teil der vorliegenden Arbeit möglichen Regulationsmechanismen des 2-Oxoglutarat-Umsatzes gewidmet. Da 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase der kompetitiven Hemmung durch Succinyl-CoA unterliegt (Garland, 1964), galt das Interesse dem Verhalten von Succinyl-CoA unter Glucagon.

Im Zusammenhang mit dem 2-Oxoglutarat-Abbau wurde auch der Einfluß des anorganischen Phosphats (P_a) untersucht, dessen cytosolische Konzentration unter Glucagon zunimmt (Siess et al., 1982a). Diese Untersuchung schien lohnenswert, da die Substratkettenphosphorylierung P_a in stöchiometrischen Mengen benötigt und durch ein erhöhtes P_a-Angebot an die Mitochondrien möglicherweise gefördert werden könnte. Als Modell für diese Experimente wurden isolierte Mitochondrien gewählt, die mit verschiedenen P_a-Konzentrationen inkubiert und anschließend auf ihren Metabolitgehalt hin analysiert wurden.

Im Unterschied zu den bisher angesprochenen Arbeiten zur Glucagon-Wirkung auf den Mitochondrienstoffwechsel stehen die Untersuchungen an Mitochondrien, die nach Glucagon-Behandlung intakter Ratten isoliert worden waren. Dabei erhielten narkotisierte Ratten eine Glucagon-Lösung, bevor ihnen 10-20 Minuten später die Leber entnommen wurde. Die Mitochondrien, die daraus präpariert werden, unterliegen notwendigerweise einem Isolationsprozess. Somit besteht die Möglichkeit, daß die Isolationsbedingungen, wie z.B. die Zusammensetzung des Isolationsmediums, die Funktionserhaltung der Mitochondrien beeinflussen und sich bei Kontrollmitochondrien anders auswirken als nach Hormongabe. Der mögliche Einfluß des Isolationsvorgangs wurde in den bisher erschienenen Arbeiten zur Glucagon-Wirkung an isolierten Mitochondrien nicht berücksichtigt. Vielmehr interpretierten die Autoren ihre Ergebnisse im Sinne einer Aktivierung der Mitochondrien durch Glucagon, die selbst nach ihrer Isolierung erhalten bleibt. Dieses Aktivierungsphänomen konnte für etwa 15 mitochondriale Parameter gezeigt werden (Übersicht siehe Siess & Wieland, 1980), insbesondere eine signifikante Steigerung der Pyruvat-Carboxylierung (Adam & Haynes, 1969 ; Yamazaki & Haynes, 1975) und der Status-3-Atmung (Yamazaki, 1975).

Angesichts der Vielzahl diesbezüglicher Arbeiten erschien es notwendig, einzelne Faktoren der bisher geübten Technik der Mitochondriengewinnung und -verwendung detailliert zu untersuchen, und auf dieser Grundlage die Interpretation der bisherigen Experimente kritisch zu überprüfen. Dies ist der Gegenstand des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit.

II. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Materialien

1.1. Geräte

Eppendorf Zentrifuge 3200
Eppendorf Thermostat 3401
Eppendorf Rotationsmischer 3300
Eppendorf Photometer 1101 M mit
Küvettenwechselautomatik 2705 und
Kompensationsschreiber 6512
Fa. Eppendorf Gerätebau Netheler und Hinz, Hamburg

Sorvall Kühlzentrifuge "Superspeed RC2-B"
Ivan Sorvall Inc., Norwalk, Conneticut, USA

Standzentrifuge Typ UJ 3
Fa. Christ, Osterode/Harz

Schüttelwasserbad
Gesellschaft für Labortechnik mbH & Co., Hannover

Phasenkontrastmikroskop "Orthoplan"
Ernst Leitz GmbH, Lahn-Wetzlar

Beckman Zentrifuge Microfuge B
Beckman, München

Waage Mettler P 160
Analysenwaage Typ H 15
Fa. Spoerhase AG, Lahn-Gießen

Perfusionskammer, Eigenbau

Rollpumpe Favorit 5000
Fa. Deuster, München

Flüssigkeitsszintillationszähler Tri Carb 574
Packard, Frankfurt/Main

pH-Meter PHM62 Radiometer Copenhagen
Fa. Hillerkurs, Krefeld

Two Wavelength Double Beam Spectrophotometer Typ 356
Perkin Elmer Bodenseewerk, Überlingen

XY-Schreiber Servogor RE 551
Goerz Elektro Ges., Wien

Shimadzu Double-Beam/Difference/Dual-Wavelength Recording
Spectrophotometer UV-300
Shimadzu, Düsseldorf

Magnetrührer und "Press to Mix" Cenco
Cenco Deutschland GmbH, Haan/RHLD

Mikro-Dismembrator
B.Braun, Melsungen

Ultrorac Fraction Collector 7000
LKB-Instruments GmbH, München

1.2. Chemikalien

1.2.1. Anorganische und organische Chemikalien

Carbogen ($95\%\ O_2$, $5\%\ CO_2$)	Linde, München
Silikonöle AR 20 und AR 200	Wacker, Burghausen
Aktivkohle Norit A	Merck, Darmstadt
Digitonin	
Na-Pentobarbital "Nembutal" 60 mg/ml	CEVA, Badseberg
Permablend III	Packard, Frankfurt
Heparin-Natrium "Thrombophob"	Nordmark, Hamburg
Äthanol absolut	Roth, Karlsruhe
Dioxan, Rotitainer Qualität	
Scintigel	
Polyäthylenglykol Typ 6000	
Saccharose	
Lubrol WX	ICI, Frankfurt
Bio-Rex 70, 200-400 mesh	Bio Rad, München
Triäthanolamin	Boehringer, Mannheim
Whatman, DE32-Cellulose	Fa. Vetter, Wiesloch
Blue Sepharose CL-6B	Pharmacia, Freiburg

MOPS	Serva, Heidelberg
Dithiothreit	
D,L-Carnitin	
Phenazinmethosulfat	
Gelatine, reinst	
Ammoniumsulfat	
L-Ornithin	
L-Citrullin	
EGTA	
Phenyläthylamin	
Trypanblau	
Dowex 1x8, 200-400 mesh	
Jodacetamid	
Acetoacetat, Li-Salz	Sigma, Taufkirchen
L-Lactat	
Succinyl-CoA	
Dimethylaminobenzaldehyd	
TES	
Diacetylmonoxim	
Thiosemicarbazid	
Acetylaceton	
Dinitrophenol	
Pyridoxal-5'-Phosphat	
δ -Aminolaevulinsäure	

Alle anderen Chemikalien wurden von Merck, Darmstadt, als p.a. Substanzen bezogen.

1.2.2. Biochemikalien

Collagenase Typ CLS	Worthington, Freehold, USA
Albumin aus Rinderserum	Behring, Marburg

Glucagon, synthetisch	Hoechst, Frankfurt
Glucagon	Serva, Heidelberg

2-Oxoglutarat-Dehydrogenase wurde freundlichst von Frau Dr. Paetzke aus unserem Institut zur Verfügung gestellt.

Alle anderen Enzyme und Coenzyme wurden von Boehringer, Mannheim, bezogen. Enzymkristallsuspensionen wurden vor Verwendung zentrifugiert, der Ammoniumsulfat-Überstand verworfen und die Enzymkristalle in H_2O oder Puffer aufgenommen.

1.2.3. Radiochemikalien

(2,3-^{14}C) Succinat 45.4 mCi/mmol	New England Nuclear, Dreieich
2-(1-^{14}C)-Oxoglutarsäure Na-Salz, 53.6 mCi/mmol	
δ-(3,5-^{3}H(N))-Aminolaevulinsäure-Hydrochlorid, 1.3 Ci/mmol	
Na-^{14}C-Bicarbonat 0.1 mCi/mmol	Amersham, Braunschweig

1.3. Versuchstiere

Männliche Sprague-Dawley Ratten von 160-300 g Gewicht wurden von Ivanovas, Kislegg/Allgäu bezogen und unter Standardbedingungen: 22-24°C, 50% Luftfeuchtigkeit, 12 h Licht (7°°-19°° Uhr), gehalten. Als Standarddiät wurde "ssniff" Alleindiät für Ratten (D-4700 Soest) verwendet.

2. Methoden

2.1. Isolierung von Succinyl-CoA-Transferase aus Schafsnieren

Die Isolierung der Succinyl-CoA-Transferase (EC 2.8.3.5) erfolgte nach der Vorschrift von Sharp et al. (1978). Alle Schritte wurden,wenn nicht anders angegeben, bei 4°C ausgeführt.

Rohextrakt:

200 g gefrorene Schafsnieren wurden mit 600 ml 0.4 M KCl-Lösung, die 20% Äthanol enthielt, 5 min homogenisiert. Das Homogenat wurde 20 min bei 10000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde zweimal je 10 h gegen 10 l eines 10 mM K_2HPO_4-Puffers pH 7.0 mit 1 mM EDTA dialysiert.
Gesamtaktivität: 15006 E
Spezifische Aktivität: 1.9 E/mg

Ammoniumsulfatfällung:

Der Extrakt wurde mit 27.8 g festem $(NH_4)_2SO_4$/100 ml auf eine Sättigung von 45% gebracht. Nach 30 min Rühren wurde der Niederschlag 20 min bei 10000 x g abzentrifugiert und verworfen. Der Überstand wurde mit 9.8 g $(NH_4)_2SO_4$/100 ml auf 60% gesättigt und 30 min gerührt. Der Niederschlag wurde mit 40 ml Puffer I (5mM K_2HPO_4-Puffer pH 7.5, 1 mM EDTA) aufgenommen und über Nacht gegen zweimal 10 l Puffer I dialysiert.
Gesamtaktivität: 13040 E
Spezifische Aktivität: 5.6 E/mg

DEAE-Cellulose-Chromatographie:

Die dialysierte Fraktion wurde mit 0.1 N KOH auf pH 8 eingestellt und auf eine zuvor mit Puffer II (5 mM K_2HPO_4-Puffer pH 8, 1 mM EDTA) äquilibrierte DEAE-Cellulose (DE 32)-Säule (5 cm x 20 cm) aufgetragen. Das Eluieren des ungebundenen Enzyms erfolgte bei Raumtemperatur mit Puffer II. Der pH-Wert des Eluats wurde mit 0.1 N Essigsäure auf 7.5 eingestellt.
Gesamtaktivität: 10880 E
Spezifische Aktivität: 27.2 E/mg

Bio-Rex 70-Chromatographie:

Die Succinyl-CoA-Transferase wurde anschließend über eine Bio-Rex 70-Säule (4 cm x 30 cm), die mit Puffer I äquilibriert war, bei Raumtemperatur gereinigt. Die Chromatographie begann mit 400 ml Puffer I, der 0.05 M KCl enthielt, und wurde mit einem linearen Gradienten von 0.05 - 0.15 M KCl in Puffer I fortgesetzt. Die aktiven Fraktionen wurden vereint.
Gesamtaktivität: 8204 E
Spezifische Aktivität: 142.5 E/mg

Ammoniumsulfatfällung:

Das Enzym wurde durch Zugabe von 56 g $(NH_4)SO_4$/100 ml, das einer Sättigung von 80% entsprach, konzentriert, 30 min bei 4°C gerührt und 20 min bei 10000 x g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in Puffer I suspendiert und über Nacht gegen 10 l Puffer I dialysiert.
Gesamtaktivität: 4185 E
Spezifische Aktivität: 106 E/mg

Blue Sepharose-Chromatographie:

Die weitere Reinigung der Succinyl-CoA-Transferase erfolgte durch eine Chromatographie über Blue Sepharose (Cibacron Blue F36-A kovalent an Agarose-Gel-Sepharose CL-6B gebunden). Die Elution der mit Puffer I äquilibrierte Blue Sepharose-Säule (1.5 cm x 20 cm) wurde bei Raumtemperatur mit Puffer I begonnen und mit einem 300 ml linearen Gradienten von 0-0.25 M KCl in Puffer I fortgesetzt. Die aktiven Fraktionen wurden über Nacht gegen 10 l Puffer I dialysiert.

Gesamtaktivität: 2850 E

Spezifische Aktivität: 224 E/mg

Einengen mit Polyäthylenglykol:

Succinyl-CoA-Transferase wurde durch Dialysieren gegen eine 25% Polyäthylenglykollösung eingeengt. Das Enzym wurde bei -20°C aufbewahrt, wobei nach 6 Monaten die Aktivität auf die Hälfte abgefallen war.

Gesamtaktivität: 1832 E

Spezifische Aktivität: 172 E/mg

Der Anreicherungsgang ist in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1: Anreicherung von Succinyl-CoA-Transferase aus Schafsnieren

Fraktion	Volumen (ml)	Protein (mg/ml)	Gesamtaktivität (E)	Spezifische Aktivität (E/mg)	Anreicherung	Ausbeute %
Rohextrakt	820	9.8	15006	1.9	1 x	100
Ammoniumsulfat-fällung	80	28.9	13040	5.6	3 x	87
DE 32	200	2.0	10880	27.2	14 x	73
Bio-Rex 70	180	0.32	8204	142.5	75 x	55
Ammoniumsulfat-fällung	18	2.2	4185	106.0	56 x	28
Blue Sepharose	75	0.17	2850	224.0	118 x	19
Polyäthylenglykol	15	0.71	1832	172.0	90 x	12

2.2. Herstellung von Reagenzien

2.2.1. Krebs-Henseleit-Puffer

Als Standardpuffer für Zellisolation und Zellinkubation wurde Ca^{2+}-freier Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffer verwendet (Krebs & Henseleit, 1932), der sich wie folgt zusammensetzt:

1000 ml	0.9% NaCl
210 ml	1.3% $NaHCO_3$
40 ml	1.15% KCl
10 ml	3.82% $MgSO_4 \times H_2O$
10 ml	2.11% KH_2PO_4

Um eine Verarmung der Zellen an Carnitin zu vermeiden, wurden diesem Puffer stets 1.27 ml 2 M D,L-Carnitin (2 mM Endkonzentration) zugesetzt (Christiansen et al., 1976).

2.2.2. Medium zur Isolation von Mitochondrien

Das Saccharose-Medium bestand aus 0.3 M Saccharose, 1 mM EDTA und 5 mM TES. Der pH-Wert wurde mit 1 N NaOH auf 7.4 eingestellt. Das Mannit-Medium enthielt 0.3 M Mannit an Stelle von Saccharose.

2.2.3. Herstellung der Szintillationsflüssigkeit

5.5 g	Permablend III (91% PPO, 9% Bis-MSB) (Bis-MSB = p-bis-(o-methylstyryl)-Benzol)
100 g	abs. Äthanol
20 g	Äthylenglykol
50 g	Naphthalin

wurden auf 1 l mit technischem Dioxan gelöst.

2.2.4. Herstellung von Acetoacetyl-CoA

Die Herstellung von Acetoacetyl-CoA erfolgte nach einer Vorschrift von Decker (1955) durch Umsetzung von CoASH mit Thioglykolsäure.

2.2.5. Herstellung des fettfreien Albumins

Rinderserum-Albumin wurde nach der Vorschrift von Chen (1967) durch Behandlung mit Aktivkohle von Fettsäuren befreit.

2.2.6. Atmungsmedium

Zur Inkubation isolierter Mitochondrien wurde das Atmungsmedium nach Yamazaki (1975) von folgender Zusammensetzung verwendet:

			Endkonzentration (mM)
0.2	ml	1 M $MgCl_2$	0.2
5	ml	1 M K_2HPO_4	5
10	ml	0.1 M EGTA	1
10.46	g	MOPS	50
5.96	g	KCl	80

Der pH-Wert wurde mit 1 N NaOH auf 7.0 eingestellt. Vor Gebrauch wurden dem Puffer 0.6 mg Albumin/ml zugegeben. Erfolgte die Inkubation der Mitochondrien ohne Phosphat, so wurde das Medium ohne Zusatz von K_2HPO_4 bereitet.

2.3. Glucagon-Behandlung intakter Ratten

Männliche Sprague-Dawley Ratten (200-300 g) wurden durch intraperitoneale Injektion von 0.1 ml Nembutal (6% Lösung) je 100 g Körpergewicht betäubt. Dabei wurden nur solche, die innerhalb von 5 min eingeschlafen waren, für den Ver - such ausgesucht. Nach 15 min wurden 0.1 ml einer Glucagon-Lösung (Yamazaki, 1975), die 20 µg Glucagon entsprachen, in eine Schwanzvene gespritzt, wobei die Kontrollratten nur das Lösungsmittel bekamen. Nach weiteren 10 min wurde die Leber entnommen.

Die Glucagon-Lösung wurde folgendermaßen hergestellt: 0.5 mg Glucagon (Serva) wurden in 0.5 ml 10 mM NaOH gelöst und anschließend mit einer 0.9% NaCl-Lösung, die 5 mg Rinderserum-Albumin/100 ml enthielt, 1:5 verdünnt. Als Kontroll-Lösung wurde eine entsprechend verdünnte 10 mM NaOH verwendet.

2.4. Herstellung des Leberextraktes

Extrakte aus gefriergestoppter Leber wurden nach der Methode von Williamson & Corkey (1969) hergestellt. Männliche Sprague-Dawley Ratten wurden durch intraperitoneale Injektion von Nembutal (0.1 ml einer 6% Lösung je 100 g Körpergewicht) betäubt. Die Leber wurde herausgeschnitten und sofort zwischen einer Aluminiumzange, die zuvor in flüssigem Stickstoff gekühlt war, gepreßt (Wollenberger, 1958). Die so gefriergestoppte Leber wurde in Aluminiumfolie gewickelt und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Danach wurden die zerkleinerten Leberstückchen in einem Dismembrator pulverisiert. Die Extraktion erfolgte mit 2-fachem Volumen 6% eiskalter Perchlorsäure. Nach 2 min Homogenisieren in einem Glas-Teflon-Homogenisator bei einem Umdrehungszahl von 1500-2000 UpM wurde der Rückstand durch

Zentrifugieren bei 15000 x g und 4°C entfernt. Das Pellet wurde erneut mit dem gleichen Volumen 6% Perchlorsäure gewaschen und wie oben zentrifugiert. Die vereinten Überstände wurden mit festem $KHCO_3$ in der Kälte neutralisiert und das ausgefallene $KClO_4$ durch Zentrifugieren entfernt. Bei der Berechnung der Metabolitkonzentration wurde vorausgesetzt, daß 1 g frische Leber 5 ml Extrakt ergeben.

2.5. Präparation isolierter Mitochondrien aus Rattenleber

1 g Leber wurde mit 10 ml Isolationsmedium (Abschnitt 2.2.2.) in einem Glas-Teflon-Apparat homogenisiert und 10 min bei 650 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde weitere 10 min bei 10000 x g zentrifugiert, das mitochondriale Pellet in einem kleinen Volumen Isolationsmedium aufgenommen und kurz mit der Hand in einem Glas-Teflon-Apparat homogenisiert. Bei Experimenten mit gewaschenen Mitochondrien wurde das mitochondriale Pellet noch zweimal in je 10 ml Medium suspendiert und wie oben zentrifugiert.

2.6. Inkubation isolierter Mitochondrien

Die Inkubation isolierter Mitochondrien erfolgte unter zwei Gesichtspunkten. Zunächst wurde Status 3 durch Zusatz von ADP erzeugt. Die anschließenden Experimente wurden jedoch mit einem ADP-regenerierenden System, bestehend aus ADP, Glucose und Hexokinase, durchgeführt.

2.6.1. Ansatz für Status 3 durch Zusatz von ADP

1 ml	Atmungsmedium ohne Phosphat (siehe Abschnitt 2.2.6.)
0.02 ml	eines 58 mM, 116 mM bzw. 174 mM K_2HPO_4-Puffers pH 7.0 (P_a-Konzentration 1 mM, 2 mM bzw. 3 mM)
0.02 ml	0.23 M ADP (Endkonzentration 4 mM)

Die Inkubation bei 37°C begann mit Zugabe von 0.1 ml einer Mitochondriensuspension (siehe Abschnitt 2.5.) mit einer durchschnittlichen Proteinkonzentration von 60-70 mg/ml. Nach 2 min wurden 0.02 ml einer 29 mM bzw. 58 mM 2-Oxoglutarat-Lösung (Endkonzentration 0.5 bzw. 1 mM) zugegeben. Die Inkubation wurde nach 7 min mit 0.1 ml 70% eiskalter Perchlorsäure gestoppt (Endkonzentration 5.5%). Nach dem Zentrifugieren wurden die Extrakte mit festem $KHCO_3$ neutralisiert und das ausgefallene $KClO_4$ entfernt.

2.6.2. Ansatz für Status 3 durch ADP-regenerierendes System

1 ml	Atmungsmedium ohne Phosphat (siehe Abschnitt 2.2.6.)
0.02 ml	eines 60 mM, 120 mM bzw. 180 mM K_2HPO_4-Puffers pH 7.0 (P_a-Konzentration 1 mM, 2 mM bzw. 3 mM)
0.02 ml	6 mM ADP (Endkonzentration 0.1 mM)
0.02 ml	1.2 M Glucose (Endkonzentration 20 mM)
0.01 ml	Hexokinase (≙ 5 E)

Die Inkubation erfolgte wie unter 2.6.1. beschrieben.
In den Experimenten, in denen auch eine Citrullin-Bestimmung erfolgte, wurde dem Inkubationsansatz 10 mM Ornithin (0.01 ml einer 1.2 M Ornithinlösung) zugefügt.

2.6.3. Trennung isolierter Mitochondrien vom Inkubationsansatz

Zur Bestimmung intramitochondrialer Metabolitgehalte wurden Mitochondrien durch Zentrifugieren durch eine Ölschicht vom Inkubationsansatz getrennt. Dazu wurden 0.1-0.2 ml Inkubationsmischung in ein eisgekühltes Beckman-Reaktionsgefäß pipettiert, das 0.1 ml 12% Perchlorsäure und darüber 0.15 ml Silikonöl (AR 200 : AR 20 = 2 : 1) enthielt. Nach 2 min Zentrifugieren in einer Beckman-Zentrifuge (Modell Microfuge B) wurde das Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff gekühlt und unterhalb der Ölschicht abgeschnitten. Der Perchlorsäureüberstand wurde abpipettiert und das Pellet mit 0.05 ml 12% Perchlorsäure extrahiert. Die vereinten Extrakte wurden mit festem $KHCO_3$ neutralisiert.

2.7.Präparation isolierter Hepatozyten

Hepatozyten wurden aus 48 h-gehungerten, männlichen Sprague-Dawley Ratten (200-300 g) nach der Methode von Berry & Friend (1969) präpariert. Die Ratten wurden mit Nembutal (0.1 ml einer 6% Lösung je 100 g Körpergewicht) betäubt. Die Operationstechnik erfolgte nach der Standardmethode der Leberperfusion (Ross, 1972). Dabei wurde die Leber freigelegt und die Pfortader kanüliert. Ca^{2+}-freier Krebs-Henseleit-Puffer (siehe Abschnitt 2.2.1.) durchströmte die Leber unter einem Druck von 50 cm Wassersäule. Die ersten 50 ml Perfusat wurden verworfen, um Erythrozyten und Plasmaproteine zu entfernen. Nach Herausschneiden aus dem Körper wurde die Leber in einer thermokonstanten (37°C) Perfusionskammer rezirkulierend mit 100 ml Krebs-Henseleit-Puffer, der ständig mit Carbogen (95% O_2, 5% CO_2) begast wurde, bei einer Flußrate von 50 ml/min perfundiert. Nach

5 min wurden 60 mg Collagenase (150 U/mg) in 2 ml Krebs-Henseleit-Puffer zugegeben und die Perfusion für ca. 20-30 min fortgesetzt. Anschließend wurde die Leber in 20 ml Ca^{2+}-freiem Krebs-Henseleit-Puffer, die 1.5% Gelatine und 2 mM Lysin (Cornell et al., 1973 ; Cornell et al., 1974) enthielt mit einer Schere zerkleinert und 2 min mit Carbogen begast. Unverdaute Gewebestückchen wurden entfernt und die Zellsuspension durch 4 Lagen Gaze in einen Zentrifugenbecher filtriert, kurz mit Carbogen begast und 60 sec bei 50 x g in einer Christ-Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Zellen wurden noch zweimal mit je 30 ml gelatinehaltigem Krebs-Henseleit-Puffer gewaschen und im gleichen Medium bei einer Zellkonzentration von 0.25-0.45 x 10^8 Zellen/ml suspendiert. Während der Inkubation wurden die Zellen warm gehalten und unter ständigem Schütteln mit Carbogen begast.

Die Qualität der Zellpräparation wurde mikroskopisch durch Färbbarkeit mit 0.2% Trypanblau in 0.9% NaCl festgestellt. Hepatozyten gehungerter Ratten schlossen zu 95%-98% Trypanblau aus.

2.8. Inkubation der Hepatozyten

Die Inkubation der Zellen erfolgte nach der Methode von Siess et al. (1977). Das Inkubationsmedium setzte sich zusammen aus 1 ml Ca^{2+}-freiem Krebs-Henseleit-Puffer, der 1.5% Gelatine und 2 mM Lysin enthielt, 0.1 ml 10% entfettetem Albumin in 0.9% NaCl und 0.01 ml 110 mM $CaCl_2$. Das Gemisch wurde 5 min mit Carbogen bei Raumtemperatur begast, die Gefäße verschlossen und in einem Schüttelwasserbad bei 37°C gehalten. Die Inkubation begann mit der Zugabe von 0.2 ml Zellsuspension, die etwa 20 mg Trockengewicht entsprachen. Nach 30 min Vorinkubation wurden 5 µl einer Glucagon-Lösung (2 mg/ml in 1.3% $NaHCO_3$) , Dibutyryl-cAMP-Lösung (0.1 M in 1.3% $NaHCO_3$) oder nur Lösungsmittel (1.3% $NaHCO_3$)

zugegeben. Die Endkonzentration von Glucagon betrug 2 µM, die von Dibutyryl-cAMP 0.36 mM.

Für die Bestimmung von Succinyl-CoA in Hepatozyten wurde 1 ml Inkubationsansatz 5 sec in einer Eppendorf-Zentrifuge (Modell 3200) zentrifugiert und die Leberzellen mit 0.64 ml eiskalter 12% Perchlorsäure extrahiert. Nach dem Zentrifugieren wurde das Pellet mit 0.2 ml 12% Perchlorsäure erneut extrahiert und die vereinten Überstände mit festem $KHCO_3$ neutralisiert.

2.9. Aktivitätsbestimmung der δ-Aminolaevulinsäure-Synthetase

Die Aktivitätsbestimmung der δ - Aminolaevulinsäure - Synthetase (= ALA-Synthetase, EC 2.3.1.37) erfolgte nach den Vorschriften von Ebert et al. (1970) und Sassa et al. (1979).

Die Bestimmung der ALA-Synthetase-Aktivität nach Ebert et al. erfolgte durch Einbau ^{14}C-markierten Succinats in ALA und anschließende Messung ihrer Radioaktivität.

$$\text{Succinyl-CoA + Glycin} \xrightarrow{\text{EC 2.3.1.37}} \text{ALA + CoASH + } CO_2$$

Die Methode von Sassa et al. beruht auf die Bildung eines farbigen Komplexes. Dazu wird ALA durch Erhitzen mit Acetylaceton in das Pyrrolderivat verwandelt, das mit Ehrlichs-Reagenz (Dimethylaminobezaldehyd) zu einem roten Komplex reagiert.

2.10. Aktivitätsbestimmung der Entkoppler-abhängigen ATPase

Die Aktivität der Entkoppler-abhängigen Adenosintriphosphatase (EC 3.6.1.3) wurde nach einer von Weiner & Lardy (1974) beschriebenen Methode getestet. Als Maß für die ATPase-Aktivität diente dabei die über eine Dauer von 10 min freigesetzte Phosphatmenge, die nach der Methode von Müller (1935) bestimmt wurde.

2.11. Aktivitätsbestimmung der Glutamat-Dehydrogenase

Die Aktivitätsbestimmung der Glutamat-Dehydrogenase (EC 1.4.1.3) wurde nach einer Methode von Schmidt (1974) durchgeführt.

Prinzip:

$$\text{2-Oxoglutarat} + \text{NADH} + \text{NH}_4^+ \xrightleftharpoons{\text{EC 1.4.1.3}} \text{L(+)Glutamat} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$$

2.12. Aktivitätsbestimmung der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase

Die Aktivität der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase wurde nach einer Vorschrift von Siess & Wieland (1978a) getestet. Dabei wurde die Radioaktivität des bei der Decarboxylierung von 2-(1-^{14}C)-Oxoglutarat entstandene $^{14}CO_2$ im Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt.

2.13. Aktivitätsbestimmung der Pyruvat-Carboxylase

Die Aktivität der Pyruvat-Carboxylase (EC 6.4.1.1) wurde über die Einbaurate von ^{14}C-markiertem $NaHCO_3$ in Oxalacetat bestimmt (Adam & Haynes, 1969).

2.14. Aktivitätsbestimmung der Succinat-Dehydrogenase

Der Testansatz für die Aktivitätsbestimmung der Succinat-Dehydrogenase (EC 1.3.99.1) entsprach der Vorschrift von Arrigoni & Singer (1962). Als Elektronenakzeptor dient dabei Phenazinmethosulfat und der Farbindikator ist 2,6-Dichlorphenol-Indophenol (ε-Wert beträgt 16 $cm^2/\mu mol$). Die Enzymaktivität wurde aus der Extinktionsabnahme bei 578 nm berechnet.

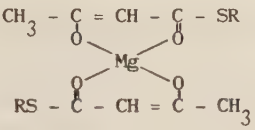
2.15. Aktivitätsbestimmung der Succinyl-CoA-Synthetase

Die Aktivität der Succinyl-CoA-Synthetase (EC 6.2.1.4) wurde durch Aufzeichnung der Extinktionszunahme der Thioesterbande von Succinyl-CoA bei 235 nm bestimmt (Cha,1969). Prinzip:

$$\text{Succinat} + \text{CoASH} + \text{GTP} \xrightleftharpoons{\text{EC 6.2.1.4}/Mg^{2+}} \text{Succinyl-CoA} + \text{GDP} + P_a$$

2.16. Aktivitätsbestimmung der Succinyl-CoA-Transferase

Die Aktivitätsbestimmung der Succinyl-CoA-Transferase (EC 2.8.3.5) beruht auf der Tatsache, daß ß-Ketoacyl-Thioester neben der Thioesterbande bei 235 nm im alkalischen Milieu eine intensive Absorption bei 300 nm (Decker, 1959) zeigen. Diese Absorption läßt sich durch Zusatz von Mg^{2+} noch erheblich verstärken, was auf die Bildung eines Chelat-Komplexes zurückzuführen ist:



Da Succinyl-CoA in diesem Bereich nicht merklich absorbiert, kann die Aktivität der Transferase entsprechend der Reaktion:

$$\text{Acetoacetyl-CoA} + \text{Succinat} \xrightleftharpoons{\text{Transferase}} \text{Acetoacetat} + \text{Succinyl-CoA}$$

durch Verfolgung der Extinktionsabnehme bei 303 nm gemessen werden.

Die Transferase-Aktivität wurde während der Isolierung des Enzyms nach einer von Williamson et al. (1971) beschriebenen und von Edwards et al. (1973) modifizierten Methode getestet. Die Aktivitätsbestimmung im Leberhomogenat erfolgte jedoch nach einer Modifikation von Zammit et al. (1979).

2.17. Acetoacetyl-CoA-Bestimmung

Acetoacetyl-CoA wurde nach einer Methode von Decker (1974) nach folgendem Prinzip bestimmt:

$$\text{Acetoacetyl-CoA} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightleftharpoons{\text{EC 1.1.1.35}} \text{3-OH-butyryl-CoA} + \text{NAD}^+$$

Ec 1.1.1.35 = 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase

2.18. Adenosindiphosphat-Bestimmung

Adenosindiphsphat wurde nach der Methode von Jaworek et al. (1974) nach folgendem Prinzip bestimmt:

$$\text{ADP} + \text{Phosphoenolpyruvat} \xrightarrow{\text{Pyruvatkinase}} \text{ATP} + \text{Pyruvat}$$

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightleftharpoons{\text{Lactatdehydrogenase}} \text{Lactat} + \text{NAD}^+$$

Pyruvatkinase = EC 2.7.1.40
Lactatdehydrogenase = EC 1.1.1.27

2.19. Adenosintriphosphat-Bestimmung

Die Adenosintriphosphat-Bestimmung erfolgte nach der Methode von Lamprecht & Trautschold (1974) nach folgendem Prinzip:

$$\text{Glucose} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Hexokinase}} \text{Glucose-6-Phosphat} + \text{ADP}$$

$$\text{Glucose-6-Phosphat} + \text{NADP}^+ \xrightarrow{\text{EC 1.1.1.49}} \text{6-Phosphogluconat} + \text{NADPH} + \text{H}^+$$

EC 1.1.1.49 = Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase

2.20. Citrullin-Bestimmung

Die Bestimmung von Citrullin nach der Vorschrift von Boyde & Rahmatullah (1980) beruht auf der Bildung farbiger Komplexe von Carbamidverbindungen wie Harnstoff oder Citrullin mit Diacetylmonoxim (2,3-Butanendionmonoxim). Durch Zusatz von Fe^{3+}-Salzen wird diese Komplexbildung katalytisch beschleunigt.

2.21. Glutamat-Bestimmung

Die Bestimmung von Glutamat erfolgte nach einer Vorschrift von Bernt & Bergmeyer (1974) nach folgendem Prinzip:

$$\text{L-Glutamat} + H_2O + NAD^+ \xrightleftharpoons{\text{EC 1.4.1.3}} 2\text{-Oxoglutarat} + NADH + NH_4^+$$

EC 1.4.1.3 = Glutamat-Dehydrogenase

2.22. Malat-Bestimmung

Malat wurde nach der Methode von Möllering (1974) nach folgendem Prinzip bestimmt:

$$\text{L-Malat} + NAD^+ \xrightarrow{\text{EC 1.1.1.37}} \text{Oxalacetat} + NADH + H^+$$

$$\text{Oxalacetat} + \text{L-Glutamat} \xrightarrow{\text{EC 2.6.1.1}} \text{Aspartat} + \text{2-Oxoglutarat}$$

EC 1.1.1.37 = Malat-Dehydrogenase
EC 2.6.1.1 = Aspartat-Amino-Transferase

2.23. 2-Oxoglutarat-Bestimmung

Die Bestimmung von 2-Oxoglutarat wurde nach der Vorschrift von Bergmeyer & Bernt (1974) nach folgendem Prinzip durchgeführt:

$$\text{2-Oxoglutarat} + \text{NADH} + \text{NH}_4^+ \xrightleftharpoons{\text{EC 1.4.1.3}} \text{L-Glutamat} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$$

EC 1.4.1.3 = Glutamat-Dehydrogenase

2.24. Phosphat-Bestimmung

Anorganisches Phosphat wurde mit einer kolorimetrischen Methode nach Müller (1935) bestimmt. Empfindlicher ist jedoch die enzymatische Bestimmung nach Guynn et al. (1972):

$$\text{Glyceraldehyd-3-P} + \text{NAD}^+ + \text{P}_a \xrightleftharpoons{\text{EC 1.2.1.12}} \text{1,3-DPG} + \text{NADH} + \text{H}^+$$

$$\text{1,3-DPG} + \text{ADP} \xrightleftharpoons{\text{EC 2.7.2.3}} \text{3-Phosphoglycerat} + \text{ATP}$$

$$\text{Fructose} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Hexokinase}} \text{Fructose-6-P} + \text{ADP}$$

Die Ausgangssubstanz, Glyceraldehyd-3-P, wurde im Test durch folgende Reaktionen gebildet:

$$\text{Fructose-1,6-Bisphosphat} \xrightarrow{\text{Aldolase}} \text{Glyceraldehyd-3-P} + \text{DHAP}$$

$$\text{DHAP} \xrightleftharpoons{\text{Triosephosphatisomerase}} \text{Glyceraldehyd-3-P}$$

1,3-DPG = 1,3-Diphosphoglycerat
DHAP = Dihydroxyacetonphosphat
Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase = EC 1.2.1.12
Phosphoglyceratkinase = EC 2.7.2.3
Hexokinase = EC 2.7.1.1
Aldolase = EC 4.1.2.13
Triosephosphatisomerase = EC 5.3.1.1

2.25. Phosphoenolpyruvat-Bestimmung

Phosphoenolpyruvat wurde nach der Methode von Czok & Lamprecht (1974) nach folgendem Prinzip bestimmt:

$$\text{Phosphoenolpyruvat} + \text{ADP} \xrightarrow{\text{Pyruvatkinase}} \text{Pyruvat} + \text{ATP}$$

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightleftharpoons{\text{Lactatdehydrogenase}} \text{Lactat} + \text{NAD}^+$$

Pyruvatkinase = EC 2.7.1.40
Lactatdehydrogenase = EC 1.1.1.35

2.26. Succinyl-CoA-Bestimmung:

Dieser Test nach Smith et al. (1973) für die Bestimmung von Succinyl-CoA verbindet die Reaktion der Succinyl-CoA-Transferase (EC 2.8.3.5) mit der von 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (EC 1.1.1.35):

$$\text{Succinyl-CoA} + \text{Acetoacetat} \xrightleftharpoons{\text{EC 2.8.3.5}} \text{Succinat} + \text{Acetoacetyl-CoA}$$

$$\text{Acetoacetyl-CoA} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{EC 1.1.1.35}} \text{3-Hydroxybutyryl-CoA} + \text{NAD}^+$$

2.27. Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration mitochondrialer Suspensionen wurde nach der Biuret-Methode (Beisenherz et al., 1953) bestimmt. Dabei wurde KCN benützt, um die Trübung zu korrigieren (Keyser & Vaughn, 1949).

Während der Isolierung der Succinyl-CoA-Transferase wurde wegen der geringen Proteinkonzentration die Methode nach Lowry et al. (1951) bevorzugt.

2.28. Berechnung der Metabolitkonzentrationen

Die Berechnung der Metabolitkonzentrationen im cytosolischen und mitochondrialen Raum basiert auf der Annahme, daß 10^8 Zellen 1 g frischer Leber (Zahlten et al., 1973) oder 0.29 g Trockengewicht (Siess et al., 1976) entsprechen und 0.4 ml cytosolisches (Bolender & Weibel, 1973) bzw. 0.048 ml mitochondriales Wasser (Scholz & Bücher, 1965 ; Klingenberg & Pfaff, 1966) enhalten. Titheradge & Coore (1976b) haben gezeigt, daß sich das mitochondriale Matrixvolumen unter Glucagon nicht verändert.

Die statistischen Angaben in den Tabellen wurden mit Student's t-Test berechnet.

III. ERGEBNISSE

1. Einfluss von Glucagon auf den hepatischen Succinyl-CoA-Gehalt

1.1. Succinyl-CoA-Gehalt gefriergestoppter Leber

Der Einfluß des Glucagons auf den hepatischen Succinyl-CoA-Gehalt wurde in gefriergestoppter Leber von Kontroll- und Glucagon-behandelten Ratten untersucht.

Tabelle 2: Wirkung von Glucagon-Behandlung auf den Succinyl-CoA-Gehalt gefriergestoppter Leber

Tiere	Succinyl-CoA (nmol /g Frischgewicht) Kontrolle	Glucagon
Gefüttert	9.5 ± 0.7	4.5 ± 0.6 a)
48 h-gehungert	15.6 ± 1.8	7.2 ± 1.9 b)

Glucagon-Behandlung von Ratten, Herstellung des Leberextraktes und Succinyl-CoA-Bestimmung wurden im Abschnitt 2.3., 2.4. und 2.26. beschrieben. Mittelwerte ± SEM sind für 11 gefütterte und 6 gehungerte Ratten angegeben.

a) $p < 0.0005$ b) $p < 0.005$

Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, bewirkt eine kurzzeitige Glucagon-Behandlung einen statistisch signifikanten Abfall von Succinyl-CoA. Dieser Abfall betrug sowohl bei gefütterten, als auch bei 48 h-gehungerten Ratten 53%, wobei gehungerte Ratten einen höheren hepatischen Succinyl-CoA-Spiegel aufwiesen.

Als Kontrolle für den beobachteten Hormoneffekt wurde neben Succinyl-CoA auch der Glutamatgehalt in gefriergestoppter Leber bestimmt, der wie bereits bekannt, unter Glucagon sowohl in perfundierter Rattenleber (Ui et al., 1973) als auch in isolierten Hepatozyten (Siess et al., 1977) abnimmt.

Tabelle 3: Wirkung von Glucagon-Behandlung auf den Glutamat-Gehalt gefriergestoppter Leber gefütterter Ratten

Glutamat (µmol /g Frischgewicht)	
Kontrolle	Glucagon
2.80 ± 0.4	1.05 ± 0.06
$p < 0.025$	

Einzelheiten siehe Legende zur Tabelle 2. Glutamat-Bestimmung wurde im Abschnitt 2.21. beschrieben. Es sind die Mittelwerte ± SEM für 4 Versuche angegeben.

Die gefundenen Glutamatgehalte (Tabelle 3) und ihre Abnahme unter Glucagon um 73% stimmen mit den von Ui et al. (1973) und Siess et al. (1977) angegebenen Werte überein.

1.2. Succinyl-CoA-Gehalt isolierter Hepatozyten

Um die Möglichkeit einer extrahepatischen Wirkung von Glucagon auszuschließen, wurde Succinyl-CoA auch in isolierten Hepatozyten bestimmt.

Tabelle 4: Einfluß von Glucagon bzw. Dibutyryl-cAMP (dB-cAMP) auf den Succinyl-CoA-Gehalt isolierter Hepatozyten

Dauer der Inkubation mit Effektor		Succinyl-CoA (nmol /g Trockengewicht) Kontrolle	Glucagon	dB-cAMP
1 min	(3)	57.1 ± 11.6	27.4 ± 11.4 [a]	
10 min	(4)	50.9 ± 8.6	32.2 ± 9.8 [b]	
	(8)	44.7 ± 6.1		23.6 ± 3.8 [c]

Hepatozyten wurden wie im Abschnitt 2.7. und 2.8. beschrieben isoliert und 30 min vorinkubiert. Danach wurde Glucagon (2 µM) bzw. dB-cAMP (0.36 mM) dem Inkubationsansatz zugefügt und die Inkubation für die angegebene Zeit fortgesetzt. Es sind die Mittelwerte ± SEM und in Klammern die Anzahl der verschiedenen Zellpräparationen angegeben.
a) $p < 0.0125$ b) $p < 0.05$ c) $p < 0.0005$

Der Succinyl-CoA-Gehalt isolierter Hepatozyten 48 h-gehungerter Ratten betrug 50.9 nmol/g Trockengewicht. Nach 10 min Inkubation mit Glucagon fiel dieser Wert auf 32.2 nmol/g Trockengewicht ab (Tabelle 4). Da 1 g Lebertrockengewicht gehungerter Ratten ca. 3.4 g Frischgewicht entspricht (Siess et al., 1976), ergaben sich für Kontroll- und Glucagon-Ratten 14.9 bzw. 9.5 nmol/g Frischgewicht. Diese Werte sind in guter Übereinstimmung mit dem gefundenen Succinyl-CoA-Gehalt gefriergestoppter Leber gehungerter Ratten (Tabelle 2).

Die in Tabelle 4 aufgeführten Daten zeigen, daß dem Inkubationsmedium zugefügtes Glucagon oder Dibutyryl-cAMP zu einer signifikanten Abnahme des zellulären Gehaltes von Succinyl-CoA um 50% führte. Diese Abnahme stimmte mit dem in den in vivo Experimenten beobachteten Hormoneffekt überein.

Tabelle 4 zeigt ferner, daß der Hormoneffekt rasch, d.h. nach 1 min abläuft und durch Verlängerung auf 10 min nicht mehr zu steigern ist.

Da die Zellen in Tabelle 4 ohne Substrat inkubiert wurden, stellte sich die Frage, wie Dibutyryl-cAMP wirken würde, wenn die Zellen nicht allein auf endogene Substrate angewiesen wären. Dazu wurden Zellen 30 min mit 8 mM Lactat vorinkubiert, bevor Dibutyryl-cAMP (0.36 mM) zugegeben und die Inkubation für weitere 10 min fortgesetzt wurde.

Das Ergebnis dieser Experimente ist in Tabelle 5 gezeigt. In Gegenwart von 8 mM Lactat im Inkubationsmedium stieg der Succinyl-CoA-Gehalt isolierter Hepatozyten um das 3-fache, vom 44.7 auf 171 nmol/g Trockengewicht (Tabelle 4 und 5). In diesem Fall bewirkte Dibutyryl-cAMP wiederum die gleiche Nettoabnahme wie in Hepatozyten ohne Lactat.

Tabelle 5: Wirkung von Dibutyryl-cAMP auf den Succinyl-CoA-Gehalt von Hepatozyten nach Inkubation mit 8 mM Lactat

	Succinyl-CoA (nmol/g Trockengewicht)	
	Kontrolle	dB-cAMP
n = 5	171.6 ± 24.4	154.8 ± 25.4
	$p < 0.05$	

Die Präparation der Hepatozyten erfolgte wie im 2.7. beschrieben. Die Hepatozyten wurden mit 8 mM Lactat 30 min vorinkubiert. Nach Zugabe von 0.36 mM Dibutyryl-cAMP (siehe Abschnitt 2.8.) wurde die Inkubation für 10 min fortgesetzt. Die Mittelwerte ± SEM sind für 5 Zellpräparationen angegeben.

Die erhaltenen Daten im gefriergestoppten Lebergewebe und isolierten Hepatozyten zeigten die signifikante Abnahme des Succinyl-CoA-Gehaltes unter Glucagon (Tabelle 2 und 4). Es lag nahe, die Ursache dieses Hormoneffektes in einem erhöhten Verbrauch von Succinyl-CoA zu vermuten. Das Ziel der folgenden Experimente war es, die Wirkung von Glucagon auf die Aktivität jener Enzyme zu prüfen, die Succinyl-CoA als Substrat verbrauchen. Als die wichtigsten Vertreter dieser Enzymgruppe wurden Succinyl-CoA-Transferase (EC 2.8.3.5), Succinyl-CoA-Synthetase (EC 6.2.1.4) und δ-Aminolaevulinsäure-Synthetase (EC 2.3.1.37) untersucht.

2. Wirkung von Glucagon auf die Aktivität der Succinyl-CoA-Transferase

Zammit et al. (1979) berichteten zum erstenmal über das Vorkommen von Succinyl-CoA-Transferase-Aktivität in der Leber, die bis dahin als unmeßbar klein angesehen wurde (Williamson et al., 1971) und gaben die Enzymaktivität im Leberhomogenat von Ratten mit 0.46 E/g Frischgewicht an. Mit diesem Testverfahren war es möglich, die Transferase-Aktivität im Leberhomogenat Glucagon-behandelter Ratten zu untersuchen. Im Gegensatz zur Vorschrift von Zammit et al. wurde in den folgenden Experimenten das Leberhomogenat nicht wie von den Autoren beschrieben in Tris-Cl-Puffer, sondern in Mannit-Puffer präpariert.

Tabelle 6 zeigt die gefundene Enzymaktivität im Leberhomogenat. Auf das Frischgewicht umgerechnet betrug die Enzymaktivität 1.0 E/g und damit doppelt so hoch wie von Zammit et al. angegeben. Glucagon-Behandlung hatte keinen Einfluß auf die Aktivität der hepatischen Succinyl-CoA-Transferase, auch wenn dem Präparationsmedium 5% Serum zur Proteasenhemmung zugesetzt worden war. Die Enzymaktivität isolierter Mitochondrien blieb nach Glucagon-Behandlung ebenfalls unverändert (Tabelle 6).

Tabelle 6: Wirkung von Glucagon-Behandlung auf die Aktivität der Succinyl-CoA-Transferase

	Kontrolle	Glucagon
	(mE/mg Protein)	
Leberhomogenat	7.40 ± 0.59	7.36 ± 0.68
Mitochondrien	10.8 ± 0.5	11.2 ± 1.1

Glucagon-Behandlung von Ratten wurde im Abschnitt 2.3. beschrieben.
Herstellung des Homogenats:
1 g Leber wurde in 5 ml Mannit-Puffer (Abschnitt 2.2.2.), der 1 mM Mercaptoäthanol, 1 mM EDTA und 3 mM $MgCl_2$ enthielt, homogenisiert und anschließend 10 min bei 650 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in den Test eingesetzt. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte nach Zammit et al. (1979).

0.2 ml Mannit-Mitochondrien (Abschnitt 2.5.) wurden in 0.2 ml Mannit-Medium (Abschnitt 2.2.2.) aufgenommen, zweimal im flüssigen Stickstoff eingefroren und anschließend wurde die Transferase-Aktivität bestimmt.

Die Mittelwerte ± SEM sind für 3 Präparationen angegeben.

3. Wirkung von Glucagon auf die Aktivität der Succinyl-CoA-Synthetase

3.1. Wirkung von Glucagon auf die Aktivität der Succinyl-CoA-Synthetase in mitochondrialen Extrakten

Succinyl-CoA-Synthetase wurde aus isolierten Mitochon- von Kontroll- und Glucagon-Ratten extrahiert und ihre Aktivität bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, daß Glucagon die extrahierbare Enzymaktivität nicht veränderte.

Tabelle 7: Wirkung von Glucagon-Behandlung auf die Aktivität von Succinyl-CoA-Synthetase in mitochondrialen Extrakten

Kontrolle	Glucagon
(mE/mg Protein)	
139 ± 2.6	141 ± 2.6

Glucagon-Behandlung von Ratten wurde im Abschnitt 2.3. beschrieben.
Herstellung des mitochondrialen Extraktes:
20 µl Mitochondriensuspension (50 mg/ml, siehe Abschnitt 2.5.) wurden 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 0.1 ml 0.1 M Tris-Acetat-Puffer pH 7.4, der 0.1% Lubrol enthielt, aufgenommen, zweimal im flüssigen Stickstoff eingefroren und anschließend 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde nach der Methode von Cha (1969) getestet. Die Mittelwerte ± SEM sind für 3 Präparationen angegeben.

3.2. Wirkung von Dibutyryl-cAMP auf die Aktivität der Succinyl-CoA-Synthetase in Zellextrakten

Tabelle 8 zeigt die Aktivität der Succinyl-CoA-Synthetase, die aus isolierten Hepatozyten extrahiert wurde. Die Inkubation der Zellen mit Dibutyryl-cAMP hatte keinen Einfluß auf die extrahierbare Enzymaktivität.

Tabelle 8: Wirkung von Dibutyryl-cAMP (dB-cAMP) auf die Aktivität der Succinyl-CoA-Synthetase in Zellrxtrakten

Kontrolle	dB-cAMP	
80.4 ± 4.1	79.3 ± 5.4	(mE/mg Extraktprotein)
18.9 ± 1.0	18.6 ± 1.2	(mE/mg Zelltrockengewicht)

0.4 ml Inkubationsansatz (siehe Abschnitt 2.8) wurden nach 10 min Inkubation mit dB-cAMP (0.36 mM) bzw. Lösungsmittel in ein Reaktions - gefäß mit 0.5 ml Öl (AR200 : AR20 = 1 : 3) pipettiert und 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 0.4 ml 0.22 M Tris-Acetat-Puffer pH 7.4, der 0.1% Lubrol enthielt, aufgenommen. Die Suspension wurde zweimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend 2 min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in den Test eingesetzt.
Die Mittelwerte ± SEM sind für 4 Präparationen angegeben.

3.3. Mögliche Effektoren der Succinyl-CoA-Synthetase

Unter der Einwirkung von Glucagon wird die Konzentration bestimmter Metabolite verändert (Siess et al., 1977). Es war deshalb von Interesse zu untersuchen, ob diese Metabolite als Effektoren der Succinyl-CoA-Synthetase in Frage kommen und somit eine Rolle bei der Regulation der Enzymaktivität unter Glucagon spielen können. Wären z.B. jene Metabolite, deren Konzentration unter Glucagon abnimmt, zugleich Inhibitoren des Enzyms, so wäre eine Stimulierung der Synthetase unter Glucagon zu erwarten.

In Tabelle 9 sind einiger dieser Metabolite und ihre Wirkung auf die Enzymaktivität angegeben. Mit Ausnahme von Glutamat und ATP führten alle in der Tabelle 9 aufgeführten Substrate zu einer Hemmung des Enzyms. Der Zusatz von Glutamat, selbst in einer sehr hohen Konzentration (10 mM), veränderte die Enzymaktivität nicht. ATP bewirkte in einer Konzentration zwischen 0.1-0.4 mM eine Aktivierung um 20%, bei höherer Konzentration jedoch nahm die Enzymaktivität ab.

Tabelle 9: Mögliche Effektoren der Succinyl-CoA-Synthetase

Substrat	Konzentration (mM)	Veränderung unter Glucagon	Wirkung auf Enzymaktivität
Acetyl-CoA	0.01-0.5	Zunahme	Hemmung
cAMP	ab 0.7	Zunahme	Hemmung
ATP	0.1-0.4	Zunahme	Aktivierung
ATP	0.4-1.0	Zunahme	Hemmung
2-Oxoglutarat	ab 5	Abnahme	Hemmung
Succinyl-CoA	bis 0.5	Abnahme	Hemmung
Glutamat	bis 10	Abnahme	keine

Die angegebenen Substrate wurden vor der Aktivitätsbestimmung zum mitochondrialen Extrakt in die Küvette gegeben. Die Herstellung des mitochondrialen Extraktes wurde in der Legende zur Tabelle 8 beschrieben.

4. Wirkung von Glucagon auf die Aktivität der δ-Aminolaevulinsäure-Synthetase

4.1. Aktivitätsbestimmung der δ-Aminolaevulinsäure-Synthetase im Leberhomogenat

Die Aktivitätsbestimmung der δ-Aminolaevulinsäure-Synthetase (=ALA-Synthetase, EC 2.3.1.37) erfolgte sowohl nach der Methode von Ebert et al. (1970), als auch nach Sassa et al. (1979).

4.1.1. Aktivitätsbestimmung nach Ebert

Die ^{14}C-markierte ALA, die bei dieser Methode durch die Reaktion von ^{14}C-Succinat mit Glycin gebildet wurde (siehe Abschnitt 2.9.), wird chromatographisch auf Dowex 50-Säulen von nicht umgesetztem ^{14}C-Succinat getrennt. ^{14}C-ALA wird als letzte Fraktion mit Ammoniak eluiert.

Um die Reproduzierbarkeit der einzelnen Elutionsschritte zu prüfen, wurden verschiedene Konzentrationen einer Tritium-markierten ALA als Standard einem "toten" Homogenat (mit Säure gestoppt) zugegeben und die Bestimmung nach Vorschrift durchgeführt.

Tabelle 10 zeigt die Wiederfindung der eingesetzten ALA in der Ammoniak-Fraktion. Sie betrug durchschnittlich 88%.

Für die weiteren Untersuchungen war es notwendig, daß die Linearität der ALA-Bildung sowohl für die Homogenatkonzentration als auch für die Inkubationsdauer erfüllt war. Abbildung 1 zeigt die Abhängigkeit der ALA-Bildung von der Homogenatkonzentration im Inkubationsansatz. Daraus geht hervor, daß die Homogenatkonzentration höchstens 1% betragen durfte. In den folgenden Experimenten betrug die Homogenatkonzentration 0.5% bzw, 0.25%.

Tabelle 10: Wiederfindung der eingesetzten ^{3}H-ALA im Leberhomogenat

Probe	eingesetzte Radioaktivität (cpm)	gefundene Radioaktivität (cpm)	Wiederfindung %
1	36,000	33,520	93
2	85,500	71,820	84
3	178,500	162,875	91
4	361,200	311,800	86
5	757,200	637,429	84

Je 10 µl einer ^{3}H-ALA-Lösung verschiedener Verdünnungen wurden dem bereits mit Trichloressigsäure gestoppten Leberhomogenat zugegeben. Die Radioaktivität der Proben vor dem Auftragen auf die Chromatographiesäulen (Dowex 50) wurde als 100% festgelegt.

Herstellung des Leberhomogenats:

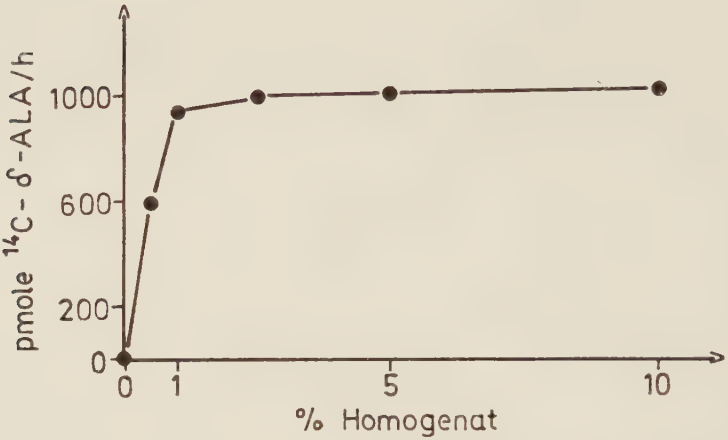
1 g Leber 24-48 h gehungerter, männlicher Ratten (180-200 g) wurde mit 9 ml Mannit-Puffer (siehe Abschnitt 2.2.2.) homogenisiert, 10 min bei 270 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand in den Test eingesetzt.

Inkubation:

Der Inkubationsansatz enthielt: 200 mM Glycin, 150 mM Tris-Cl - Puffer pH 7.2, 20 mM EDTA, 0.4 mM Pyridoxal-5'-Phosphat, 1 µCi ^{14}C - Succinat und 0.8 mM Succinat.

Je 1 ml Inkubationsgemisch und Homogenat (1:20 mit Mannit-Puffer verdünnt) wurden 1 min bei 37°C vorgewärmt, bevor sie zusammengegeben und bei 37°C 10 min in einem Schüttelwasserbad inkubiert wurden. Die Reaktion wurde mit 0.5 ml 25% Trichloressigsäure (Endkonzentration 5%) gestoppt und zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 5 ml 1% Trichloressigsäure gewaschen und zentrifugiert. Die vereinten Überstände wurden nach Vorschrift (Abschnitt 2.9.) auf Dowex 50-Säulen aufgetragen und ALA getrennt.

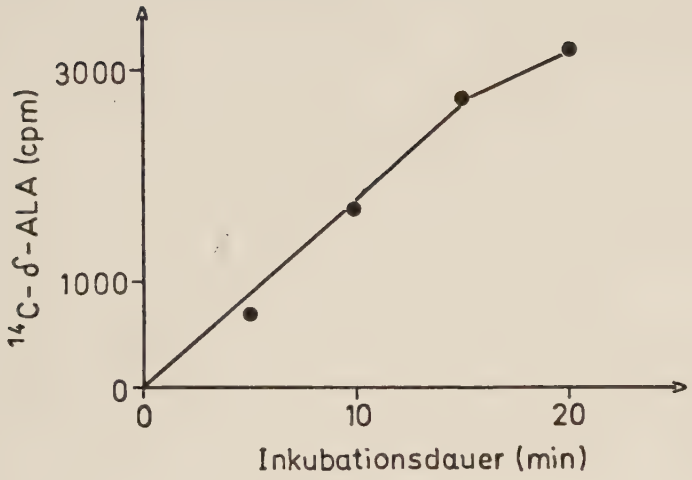
Abbildung 1: Abhängigkeit der ALA-Bildung von der Homogenatkonzentration



1 ml 10% Homogenat entsprach 0.1 g Leber bzw. 13.1 mg Protein. Die Herstellung des Homogenats und die Inkubation wurden in der Legende zur Tabelle 10 beschrieben.

Abbildung 2 zeigt die Abhängigkeit der ALA-Bildung von der Inkubationsdauer. Die Bildungsrate verlief bis 15 min linear.

Abbildung 2: Abhängigkeit der ALA-Bildung von der Inkubationsdauer



Die Konzentration des Leberhomogenats betrug 0.5%. Die Herstellung des Homogenats sowie der Inkubationsansatz wurden in der Legende zur Tabelle 10 beschrieben.

In der Vorschrift von Ebert et al. wurden die Leberhomogenate in einem 10 mM Tris-0.9% NaCl-Puffer pH 7.4 hergestellt. Ein Vergleich der Aktivitäten der ALA-Synthetase in Tabelle 11 zeigt, daß Präparationen im Mannit-Medium eine deutlich höhere Enzymaktivität aufwiesen. Die Homogenate der folgenden Experimente wurden daher in Abweichung von der Orginalvorschrift im Mannit-Medium (Abschnitt 2.2.2.) präpariert.

Tabelle 11: Einfluß des Präparationsmediums auf die Aktivität der ALA-Synthetase im Leberhomogenat

Präparationsmedium	Aktivität (nmol/h/mg Protein)
10 mM Tris-0.9% NaCl	0.67 ± 0.06
Mannit	1.40 ± 0.05

Die Mittelwerte ± SEM sind für 3 Präparationen angegeben.
Die Herstellung des Homogenats und der Inkubationsansatz wurden in der Legende zur Tabelle 10 beschrieben.

4.1.2. Aktivitätsbestimmung nach Sassa

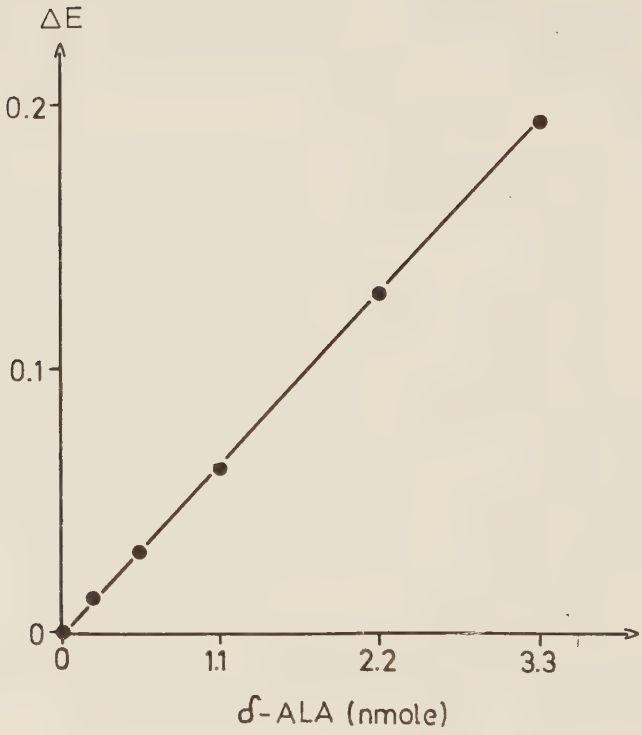
Die Aktivität der ALA-Synthetase wurde auch nach einer von Sassa et al. (1979) beschriebenen Methode (Abschnitt 2.9.) bestimmt.

Abbildung 3 zeigt die Extinktionsänderung des farbigen Komplexes aus ALA und Dimethylaminobenzaldehyd in Abhängigkeit von der ALA-Konzentration. Aus der Eichkurve ergab sich eine Extinktionsdifferenz von ca. 0.06 für 1 nmol ALA.

Legende zur Abbildung 3:

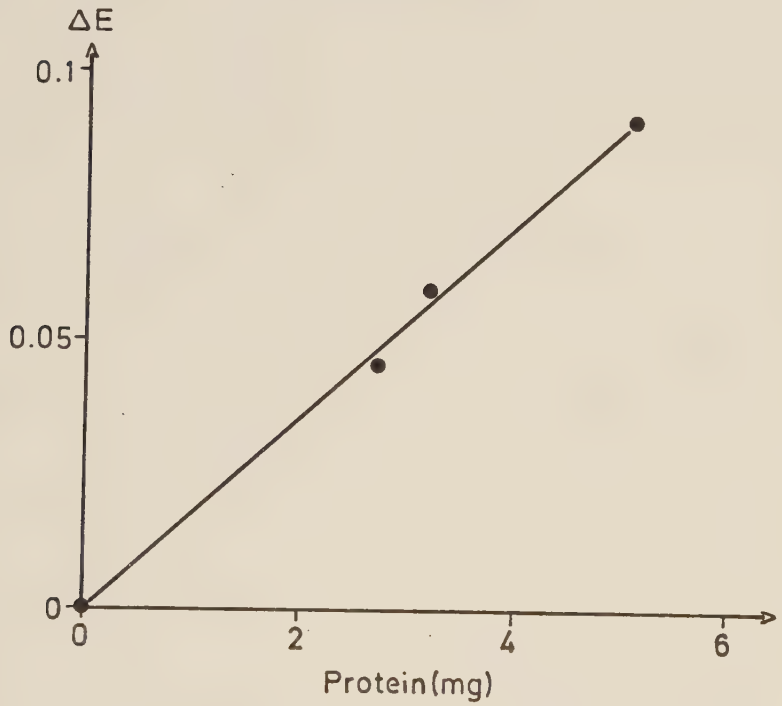
Der Testansatz bestand aus einer 1:1-Mischung aus 75 mM Tris - Puffer pH 7.4 und 75 mM K_2HPO_4-Puffer pH 7.4, die 75 mM Glycin, 75 mM Citrat, 15 mM $MgCl_2$, 7.5 mM EDTA und 2.2 mM Pyridoxal-5'-Phosphat enthielt. Verschiedene ALA - Konzentrationen in 0.1 ml 10% Trichloressigsäure wurden zu 0.3 ml dieser Mischung gegeben und mit 0.15 ml einer 10% Acetylaceton-Lösung (in 1 M Na-Acetat) 10 min bei 80°C erhitzt. Nach dem Erkalten wurde der pH-Wert der Mischung durch Zugabe von 0.05 ml 0.5 N Na_2HPO_4/ 1 N NaOH (1:3) auf 7.0 eingestellt und mit 0.75 ml Dichlormethan kräftig geschüttelt. Die wässrige Phase wurde mit gleichem Volumen von Ehrlichs modifiziertem Reagenz (Dimethylaminobenzaldehyd in Eisessig und 70% Perchlorsäure) vermischt und die Extinktion nach 15 min bei 553 nm gemessen. Der ε-Wert beträgt 58 $mM^{-1}cm^{-1}$.

Abbildung 3: Abhängigkeit der Extinktionsänderung von der ALA-Konzentration



Die Abhängigkeit der ALA-Bildung von der Homogenatkonzentration ist in Abbildung 4 dargestellt. Für die folgenden Experimente wurden die Inkubationen mit einer Proteinkonzentration von ca. 5 mg durchgeführt, die im linearen Bereich liegt.

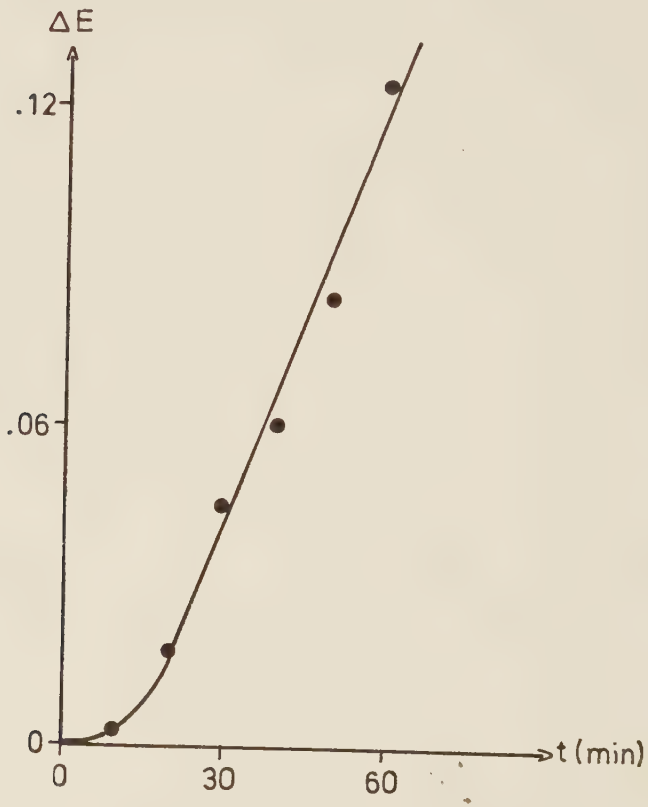
Abbildung 4: Abhängigkeit der ALA-Bildung von der Proteinkonzentration



Herstellung des Leberhomogenats: 1 g Leber 24-48 h gehungerter Ratten (ca. 200 g) wurde mit 3 ml 1.15% KCl in 0.1 M K_2HPO_4 - Puffer pH 7.4 homogenisiert. Das Homogenat wurde 15 min bei 8000 x g und 4°C zentrifugiert und das Pellet mit 3 ml Reaktionsmischung (Legende zu Abb. 3) aufgenommen und 1 h bei 37°C inkubiert und danach mit 0.1 ml 10% Trichloressigsäure gestoppt. Der Überstand wurde wie in Legende zu Abb. 3 getestet.

Wie aus Abbildung 5 hervorgeht, blieb die Bildungsrate der ALA während der Inkubationsdauer von 1 Stunde linear.

Abbildung 5: Abhängigkeit der ALA-Bildung von der Inkubationsdauer



Die Herstellung des Leberhomogenats wurde in der Legende zu Abb. 4 beschrieben. Der Inkubationsansatz wurde in der Legende zur Abb. 3 angegeben.

Der Einfluß des Präparationsmediums auf die Enzymaktivität wurde ebenfalls untersucht. Es stellte sich heraus, daß das von Sassa et al. angegebene Medium aus 1.15% KCl, 0.1 M K_2HPO_4-Puffer pH 7.4 ebenso hohe Enzymaktivitäten lieferte wie das Mannit-Medium (Abschnitt 2.2.2.). Das KCl-Medium wurde daher für die folgenden Experimente beibehalten.

Es wurde der Versuch unternommen, mit der Methode von Sassa et al., die eingentlich zur Bestimmung der ALA-Synthetase-Aktivität beschrieben war, die ALA-Konzentration in der gefriergestoppten Leber zu messen. Es zeigte sich jedoch, daß die Empfindlichkeit dieser Methode nicht ausreichte.

4.2. Aktivitätsbestimmung der δ-Aminolaevulinsäure-Synthetase in isolierten Hepatozyten

Die Aktivitätsbestimmung der ALA-Synthetase in isolierten Hepatozyten nach Ebert et al. war nicht möglich, da die Zellen kein markiertes Succinat aufnehmen können. Selbst nach einer Inkubation der Zellen mit markiertem Glycin konnte keine meßbare Aktivität festgestellt werden, da der K_M-Wert der Synthetase für Glycin bei 19 mM liegt (Whiting & Elliot, 1972) und so hohe Konzentrationen nicht zu erreichen sind.

Die ALA-Synthetase-Aktivität war auch mit der Methode von Sassa et al. nicht meßbar. Jedoch wurde vor der Inkubation zugesetzte ^{3}H-ALA in Hepatozyten zu 80% wiedergefunden.

4.3. Wirkung von Glucagon auf die Aktivität der δ-Aminolaevulinsäure-Synthetase im Leberhomogenat

Die folgenden Messungen sollten klären, ob Glucagon-Behandlung intakter Ratten die Aktivität der ALA-Synthetase im Leberhomogenat verändert. In Tabelle 12 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammengefaßt, wobei die Messung der Enzymaktivität sowohl nach Ebert et al. (1970) als auch nach Sassa et al. (1979) durchgeführt wurde.

Tabelle 12: Wirkung von Glucagon-Behandlung auf die Aktivität der ALA-Synthetase im Leberhomogenat

Methode		Kontrolle	Glucagon	
Ebert	(14)	1.81 ± 0.10	2.37 ± 0.11 [a]	nmol/h/mg Protein
		208.9 ± 13.7	276.0 ± 17.3	nmol/h/g Leber
Sassa	(8)	0.56 ± 0.03	0.77 ± 0.05 [b]	nmol/h/mg Protein
		46.0 ± 1.4	64.0 ± 3.8	nmol/h/g Leber

Glucagon-Behandlung von Ratten wurde in Abschnitt 2.3. beschrieben. Die Einzelheiten zum Testansatz nach Ebert sind in der Legende zur Tabelle 10 angegeben. Der Test nach Sassa wurde in der Legende zur Abbildung 4 beschrieben. Die Mittelwerte ± SEM sind für 14 bzw. 8 Präparationen angegeben.

a) $p < 0.025$ b) $p < 0.005$

Glucagon bewirkte eine 30% Zunahme der ALA-Synthetase-Aktivität (Tabelle 12). Die nach Ebert bestimmte Aktivität lag deutlich höher als die nach Sassa. Der Grund dieser Differenz könnte zum Teil in der unterschiedlichen Extraktionsmethode sowie in der unterschiedlichen Zusammensetzung der Inkubationsmedien liegen.

4.4. Wirkung von Glucagon auf die Aktivität der δ-Aminolaevulinsäure-Synthetase in isolierten Mitochondrien

Es erschien von Interesse, zu prüfen, in welcher Weise Glucagon-Behandlung intakter Ratten die Aktivität der ALA-Synthetase in isolierten Mitochondrien beeinflussen würde. Es zeigte sich, daß Glucagon-Behandlung eine 40% Erhöhung der Enzymaktivität bewirkte (Tabelle 13).

Tabelle 13: Wirkung der Glucagon-Behandlung auf die Aktivität der ALA-Synthetase in isolierten Mitochondrien

Kontrolle	Glucagon
(nmol/h/mg Protein)	
4.6 ± 0.1	6.4 ± 0.6
$p < 0.025$	

Glucagon-Behandlung intakter Ratten wurde im Abschnitt 2.3. beschrieben. 50 µl frisch verdünnte (1:10) Mannit - Mitochondrien (Abschnitt 2.5.) wurden in den Test nach Ebert et al. (siehe Legende zu Tabelle 10) eingesetzt. Die Mittelwerte ± SEM sind für 3 Präparationen angegeben.

5. Wirkung von anorganischem Phosphat auf den Mitochondrienstoffwechsel

Auf der Suche nach Wirkungsmechanismen des Glucagons auf den Mitochondrienstoffwechsel wurde die Zunahme des cytosolischen P_a nach Glucagon (Siess et al., 1982a) als mögliche Erklärung in Betracht gezogen. Es wurde deshalb der Einfluß von anorganischem Phosphat auf den Metabolitgehalt isolierter Rattenlebermitochondrien untersucht.

5.1. Wirkung von anorganischem Phosphat auf Metabolitgehalte isolierter Mitochondrien im Status 3

5.1.1. Einstellung von Status 3 durch Zusatz von ADP

Tabelle 14 zeigt die Wirkung von anorganischem Phosphat auf Metabolitgehalte isolierter Mitochondrien im Status 3, der durch Zusatz von ADP (4 mM) erreicht wurde. Die P_a-Konzentration im Inkubationsansatz wurde zwischen 0-3 mM variiert, da die cytosolische Konzentration etwa 3 mM beträgt (Sestoft & Bartels, 1981). Als Substrat wurde dem Inkubationsansatz 0.5 mM bzw. 1 mM 2-Oxoglutarat zugegeben (Abschnitt 2.6.1.). Während der Gehalt an Malat, Phosphoenolpyruvat und ATP mit zunehmender P_a-Konzentration stieg, blieb der Gehalt von Succinyl-CoA, der sehr niedrig war, und der von ADP ziemlich konstant. Das ATP:ADP-Verhältnis nahm entsprechend mit steigender P_a-Konzentration zu.

Tabelle 14: Wirkung von anorganischem Phosphat auf Metabolitgehalte isolierter Mitochondrien im Status 3 durch Zusatz von ADP

	2-Oxoglutarat		Malat		PEP		Succinyl-CoA		ATP		ADP		ATP:ADP	
	(nmol/mg Protein)													
2-Oxoglutarat (mM)	0.5	1	0.5	1	0.5	1	0.5	1	0.5	1	0.5	1	0.5	1
0 mM P_a	52.6± 5.2	127.8± 6.2	15.6± 1.3	16.9± 1.9	0.7± 0.2	1.0± 0.01	0.4± 0.004	0.29± 0.03	4.9± 1.0	4.4± 0.9	13.4± 1.6	11.3± 0.9	0.36	0.39
1 mM P_a	34.4± 3.9	101.4± 10.0	29.9± 1.2	34.8± 2.2	2.6± 0.13	2.3± 0.3	0.5± 0.05	0.5± 0.06	7.6± 1.7	6.3± 0.5	14.8± 1.4	12.9± 0.6	0.51	0.49
2 mM P_a	19.7± 2.8	71.9± 8.1	39.2± 1.7	57.6± 1.7	4.1± 0.6	3.1± 0.8	0.33± 0.1	0.46± 0.09	9.6± 1.2	9.4± 0.5	12.9± 1.1	13.6± 1.3	0.74	0.69
3 mM P_a	3.8± 0.3	53.9± 6.9	40.0± 3.8	67.2± 3.8	7.3± 1.3	4.6± 1.2	0.42± 0.17	0.60± 0.25	14.7± 0.9	14.5± 0.6	12.8± 2.3	9.4± 0.1	1.15	1.54

Mannit-Mitochondrien wurden wie im Abschnitt 2.5. beschrieben isoliert und zweimal gewaschen. Der Inkubationsansatz enthielt 4 mM ADP und 0.5 mM bzw. 1 mM 2-Oxoglutarat (Abschnitt 2.6.1.).

Die Mittelwerte ± SEM sind für 3 Präparationen angegeben.

PEP = Phosphoenolpyruvat

5.1.2. Einstellung von Status 3 durch ein ADP-regenerierendes System

Bei den folgenden Experimenten wurde Status 3 durch Zugabe von 0.1 mM ADP, 20 mM Glucose und 5 E Hexokinase zum Inkubationsansatz in Gegenwart von 0.5 mM bzw. 1 mM 2-Oxoglutarat eingestellt. Dieses System wurde für die weiteren Experimente bevorzugt, da es den physiologischen Verhältnissen besser entsprach als der Zusatz einer einmaligen hohen ADP-Konzentration wie im letzten Abschnitt beschrieben.

Dabei stiegen die Gehalte von Malat, Phosphoenolpyruvat und ADP mit zunehmender P_a-Konzentration, während der ATP-Spiegel ziemlich konstant blieb. Der Succinyl-CoA-Gehalt lag deutlich höher als unter einem einmaligen hohen ADP und fiel mit steigender P_a-Konzentration. Es wurde eine Zunahme des ATP:ADP-Verhältnisses nur in Gegenwart von 1 mM 2-Oxoglutarat beobachtet (Tabelle 15).

Ein Vergleich der Metabolitgehalte von Tabelle 14 und 15 zeigt, daß bei ADP-regenerierendem System der Verbrauch von 2-Oxoglutarat der isolierten Mitochondrien mit steigender P_a-Konzentration sehr viel schneller erfolgte, als im Status 3 mit ADP-Zusatz. Dies dürfte auf die kontinuierliche Bereitstellung von ADP während der Inkubation unter Zusatz von Glucose und Hexokinase zurückzuführen sein (Tabelle 15).

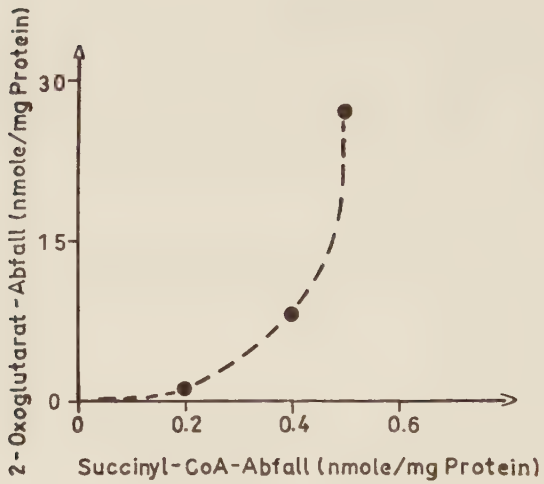
In qualitativer Übereinstimmung mit der Feedback-Hemmung der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase durch Succinyl-CoA bewirkt der P_a-bedingte Abfall von Succinyl-CoA den erhöhten Verbrauch von 2-Oxoglutarat (Abbildung 6).

Tabelle 15: Wirkung von anorganischem Phosphat auf Metabolitgehalte isolierter Mitochondrien im Status 3 mit einem ADP-regenerierenden System

	2-Oxoglutarat		Malat		PEP		Succinyl-CoA		ATP		ADP		ATP:ADP	
	(nmol/mg Protein)													
2-Oxoglutarat (mM)	0.5	1	0.5	1	0.5	1	0.5	1	0.5	1	0.5	1	0.5	1
0 mM P_a	37.9± 2.7	115.8± 8.2	3.9± 0.6	8.2± 1.0	0.3± 0.07	0.5± 0.07	1.7± 0.1	2.6± 0.3	1.7± 0.1	0.9± 0.1	6.1± 0.6	6.4± 0.1	0.28	0.14
1 mM P_a	10.5± 0.1	61.6± 3.4	8.0± 0.3	13.3± 0.9	2.3± 0.3	2.1± 0.07	1.2± 0.1	2.8± 0.2	2.0± 0.3	1.3± 0.08	8.8± 1.5	6.7± 0.5	0.22	0.19
2 mM P_a	3.1± 0.6	20.6± 3.9	9.1± 0.6	19.5± 2.4	3.1± 0.4	3.5± 0.4	0.8± 0.2	1.9± 0.3	2.7± 0.04	1.8± 0.1	6.6± 0.7	7.0± 0.9	0.4	0.26
3 mM P_a	1.9± 0.03	3.3± 0.3	11.4± 1.4	39.7± 2.0	6.3± 0.6	5.6± 0.8	0.6± 0.07	1.0± 0.07	1.5± 0.3	1.7± 0.2	7.9± 1.0	6.4± 0.4	0.19	0.27

Mannit-Mitochondrien wurden wie im Abschnitt 2.5. beschrieben isoliert und zweimal gewaschen. Der Inkubationsansatz enthielt 0.1 mM ADP, 20 mM Glucose, 5 E Hexokinase und 0.5 mM bzw. 1 mM 2-Oxoglutarat (siehe Abschnitt 2.6.2.). Die Mittelwerte ± SEM sind für 3 Präparationen angegeben.
PEP = Phosphoenolpyruvat

Abbildung 6: Abhängigkeit des 2-Oxoglutarat-Abfalls von der Abnahme des Succinyl-CoA-Spiegels



Die Metabolitabnahmen wurden aus Tabelle 15 berechnet.

Die Frage, ob die Erhöhung der P_a-Konzentration im Inkubationsansatz zu einer Zunahme der intramitochondrialen P_a-Konzentration führt, konnte nicht geklärt werden, da sich sowohl die kolorimetrische, als auch die enzymatische Bestimmungsmethode (Abschnitt 2.24.) als zu umempfindlich erwies.

5.2. Phosphat-Wirkung in Gegenwart von Ruthenium-Rot

Die Phosphataufnahme in intakten Mitochondrien ist mit einer gleichzeitigen Aufnahme von Ca^{2+}-Ionen gekoppelt (Wehrle & Pedersen, 1979). Um sicherzustellen, daß die beobachteten Veränderungen der Metabolitgehalte durch Phosphat nicht Ca^{2+}-abhängige Effekte waren, wurde der Phosphateinfluß in Gegenwart von Ruthenium-Rot, einem Inhibitor des Ca^{2+}-Carriers, untersucht. Tabelle 16 zeigt das Ergebnis dieser Versuche.

Selbst in Anwesenheit von 1 mM Ruthenium-Rot war der Malat-Spiegel mit 3 mM Phosphat um das 3-fache erhöht, vergleichbar mit den Untersuchungen ohne Ruthenium-Rot (Tabelle 15). Die Zunahme des Phosphoenolpyruvat-Gehalts und der Abfall des 2-Oxoglutarat-Gehalts entsprechen ebenfalls der beobachteten Phosphatwirkung in Abwesenheit von Ruthenium-Rot.

Tabelle 16: Wirkung von Phosphat auf Metabolitgehalte isolierter Mitochondrien in Gegenwart von Ruthenium-Rot

	2-Oxoglutarat		Malat		Phosphoenolpyruvat	
	(nmol/ mg Protein)					
2-Oxoglutarat (mM)	0.5	1	0.5	1	0.5	1
0 mM P_a	51.5± 4.4	130.3± 4.6	4.4± 0.6	9.2± 0.8	0.4± 0.03	0.6± 0.1
1 mM P_a	22.8± 0.2	89.9± 1.5	8.7± 1.2	12.9± 0.6	1.7± 0.4	2.2± 0.4
2 mM P_a	2.8± 0.3	37.4± 7.0	10.9± 2.2	24.0± 1.5	3.2± 0.5	3.6± 0.5
3 mM P_a	1.6± 0.4	5.7± 1.0	19.2± 3.4	43.5± 6.3	5.3± 0.9	4.9± 0.3

Mannit-Mitochondrien wurden wie im Abschnitt 2.5. beschrieben isoliert und zweimal gewaschen. Der Inkubationsansatz enthielt 0.1 mM ADP, 20 mM Glucose, 5 E Hexokinase, 1mM Ruthenium-Rot und 0.5 mM bzw. 1 mM 2-Oxoglutarat (Abschnitt 2.6.2.). Die Mittelwerte ± SEM sind für 3 Präparationen angegeben.

5.3. Phosphat-Wirkung auf die Citrullin-Bildung

Nachdem der Phosphateinfluß auf die Intermediate der Gluconeogenese und des Citrat-Zyklus beobachtet wurde (Tabelle 14 und 15), stellte sich die Frage, ob auch andere Glucagon-abhängige Mitochondrienfunktionen durch Phosphat beeinflußt werden könnten. Zu diesem Zweck wurde in den folgenden Experimenten die Citrullin-Bildung in Abhängigkeit von der P_a-Konzentration im Inkubationsansatz untersucht.

Es stellte sich heraus, daß die Geschwindigkeit der Citrullin-Bildung ebenfalls mit steigender P_a-Konzentration zunahm (Tabelle 17).

Tabelle 17: Abhängigkeit der Citrullin-Bildung von der P_a-Konzentration

Phosphat (mM)	Citrullin (nmol/mg Protein)
0	1.3 ± 0.2
1	3.0 ± 0.2
2	9.8 ± 0.09
3	16.8 ± 1.6

Gewaschene Mannit-Mitochondrien (Abschnitt 2.5. wurden wie im Abschnitt 2.6.2. beschrieben mit 0.1 mM ADP, 20 mM Glucose, 5 E Hexokinase, 1 mM 2-Oxoglutarat und 10 mM Ornithin inkubiert. Die Mittelwerte ± SEM sind für 3 Präparationen angegeben.

6. Stabilisierende Wirkung von Glucagon auf mitochondriale Funktionen

Wie bereits eingangs erwähnt, liegen in der Literatur zahlreiche Hinweise vor, wonach Glucagon zu einer Aktivierung mitochondrialer Funktionen, wie CO_2-Fixierung, Succinat- Dehydrogenase -Aktivität, 2-Oxoglutarat -Decarboxylierung, etc. führt. Das Ziel der folgenden Experimente war es, den Mechanismus dieser Mitochondrienaktivierung weiter aufzuklären. Dabei sollte vor allem das Verhalten glucagonaktivierter Mitochondrien gegenüber unterschiedlichen Präparations- und Testbedingungen untersucht werden.

6.1. Einfluß des Isolationsmediums auf den Glucagon-Effekt

Isolierte Mitochondrien von Kontroll- und Glucagon-Ratten wurden in Saccharose- und Mannit-Medium präpariert und der Hormoneffekt auf die Succinat-Dehydrogenase-Aktivität und 2-Oxoglutarat-Decarboxylierung verglichen (Tabelle 18).

Es stellte sich heraus, daß der Hormoneffekt in Mannit-Mitochondrien weniger stark ausgeprägt war, als in Saccharose-Mitochondrien. So stieg die Decarboxylierungsrate Saccharose-präparierter Mitochondrien nach Glucagon-Behandlung um 145%, während die Zunahme bei Mannit-präparierten Mitochondrien nur 45% betrug. Die Erhöhung der Succinat-Dehydrogenase-Aktivität betrug in Saccharose-Mitochondrien etwa 70%, in Mannit-Mitochondrien aber nur etwa 35% (Tabelle 18). Diese Verminderung der Glucagon-Effekte ist darauf zurückzuführen, daß bei Mannit-Isolierung die betreffenden Aktivitäten der Kontrollmitochondrien (Decarboxylierungsrate 6-fach, Succinat-Dehydrogenase 2-fach) höher waren als in Saccharose-Mitochondrien (Tabelle 18).

Tabelle 18: Einfluß des Isolationsmediums auf den Glucagon-Effekt

	Saccharose		Mannit	
	Kontrolle	Glucagon	Kontrolle	Glucagon
2-Oxoglutarat-Decarboxylierung (nmol /min/mg Protein)	2.9 ± 0.3 (n=6)	7.1 ± 0.9 (a)	18.6 ± 2.0 (n=8)	26.9 ± 2.7 (b)
Succinat-Dehydrogenase-Aktivität (mE/mg Protein)	80.4 ± 10.6 (n=6)	139.1 ± 15.1 (c)	194.8 ± 10.2 (n=5)	262.2 ± 17.2 (d)

Mitochondrien gefütterter Ratten wurden wie im Abschnitt 2.5. beschrieben isoliert und zweimal gewaschen. Es sind die Mittelwerte ± SEM und in Klammern die Anzahl der Präparationen angegeben.

a) $p < 0.0025$ b) $p < 0.025$ c) $p < 0.01$ d) $p < 0.005$

Um sicherzustellen, daß die präparierten Mitochondriensuspensionen von Kontroll- und Glucagon-Ratten die gleichen Mengen an Mitochondrien enthielten, wurde die Aktivität der Glutamat-Dehydrogenase getestet. Es zeigte sich, daß die Hormonbehandlung keinen Einfluß auf den Mitochondriengehalt der Präparationen hatte. Die Glutamat-Deyhdrogenase-Aktivität von Kontroll- bzw. Glucagon-Mitochondrien betrug 6.0 $\pm$ 0.1 bzw. 5.9 $\pm$ 0.1 E/mg Protein.

6.2. Einfluß der Mitochondrienwaschung auf den Glucagon-Effekt

Wie die folgenden Versuche zeigen, ist nicht nur die Zusammensetzung des Inkubationsmediums, sondern auch die weitere Behandlung der Mitochondrien von Einfluß auf die Bewertung des Glucagon-Effektes. In allen bisherigen Experimenten zur Glucagon-Wirkung wurden die Mitochondrien routinemäßig einer vorausgehenden Waschung unterzogen. Untersucht man jedoch die Mitochondrien ohne sie zu waschen, so erhält man völlig andere Ergebnisse. Wie aus Tabelle 19 hervorgeht, erscheint der Glucagon-Effekt auf die gemessenen Enzymaktivitäten bei gewaschenen Mitochondrien wesentlich stärker, als bei ungewaschenen. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß die Aktivitäten der ungewaschenen Kontrollmitochondrien wesentlich höher als die der gewaschenen Kontrollen lagen, wodurch die Effekte des Glucagons erheblich schwächer erschienen.

Tabelle 19: Einfluß des Waschvorgangs auf den Glucagon-Effekt

Enzymaktivität	Ungewaschene Mitochondrien			Gewaschene Mitochondrien		
	Kontrolle	Glucagon	Zunahme	Kontrolle	Glucagon	Zunahme
Succinat-Dehydrogenase- (mE/mg Protein)	205 ± 19.0 (n=10)	232 ± 9.0	13%	72 ± 7.0 (n=10)	123 ± 14.0	71%
ATPase (nmol/min/mg Protein)	10.8 ± 2.5 (n=4)	17.9 ± 1.4	66%	4.1 ± 0.8 (n=4)	12.9 ± 3.6	215%
Pyruvat-Carboxylase (nmol CO_2 / min/mg Protein)	6.7 ± 1.0 (n=7)	12.4 ± 1.1	84%	4.7 ± 0.9 (n=7)	11.5 ± 1.4	147%

Glucagon-Behandlung von Ratten wurde im Abschnitt 2.3.beschrieben. Saccharose-Mitochondrien wurden wie im Abschnitt 2.5. beschrieben präpariert und gewaschen. Die Aktivitätsbestimmung der Succinat-Dehydrogenase, der Pyruvat-Carboxylase und der ATPase wurden in den Abschnitten 2.14. , 2.13. bzw. 2.10. angegeben. Es sind die Mittelwerte ± SEM und in Klammern die Anzahl der Präparationen angegeben.

6.3. Einfluss der Mitochondrienaufbewahrung auf den Glucagon-Effekt

Auch die Proteinkonzentration der Mitochondriensuspension und die Dauer ihrer Aufbewahrung nach Isolierung bis zum Test beeinflußten ganz wesentlich den Glucagon-Effekt auf mitochondriale Funktionen.

Tabelle 20 zeigt die Succinat-Dehydrogenase-Aktivität von ungewaschenen Saccharose-Mitochondrien, die bei einer Proteinkonzentration von 50 mg/ml bzw. 20 mg/ml eine Stunde auf Eis aufbewahrt wurden.

Tabelle 20: Abhängigkeit des Glucagon-Effektes auf die Succinat-Dehydrogenase-Aktivität von der Proteinkonzentration der Mitochondriensuspension

Proteinkonzentration (mg/ml)	Kontrolle (mE/mg Protein)	Glucagon (mE/mg Protein)	Effekt %
50	162.6 ± 8.6	209.3 ± 10.1	30
20	66.0 ± 5.1	130.9 ± 8.4	98

Glucagon-Behandlung von Ratten wurde im Abschnitt 2.3. beschrieben. Die Isolierung der Mitochondrien und die Aktivitätsbestimmung der Succinat-Dehydrogenase erfolgten wie im Abschnitt 2.5. bzw. 2.14. angegeben. Die Mittelwerte ± SEM sind für 8 Präparationen angegeben.

Der Hormoneffekt schien bei verdünnten Mitochondrien stärker ausgeprägt. Die Erhöhung der Succinat-Dehydrogenase-Aktivität nach Glucagon-Behandlung betrug bei 50 mg/ml Mitochondrien 30%, bei 20 mg/ml Mitochondrien jedoch 98% (Tabelle 20).

Eine Verdünnung der Mitochondriensuspension hatte auch eine deutliche Abnahme der Ausgangsaktivitäten zur Folge. Ein Vergleich der Kontroll-Aktivitäten zeigt, daß die Enzymaktivitäten bei 50 mg/ml Mitochondrien doppelt so hoch war als bei 20 mg/ml Mitochondrien.

Tabelle 21 zeigt, welchen Einfluß die Aufbewahrungsdauer der Mitochondrien auf den Glucagon-Effekt ausübt. Dazu wurden ungewaschene Saccharose-Mitochondrien bei einer Konzentration von 20 mg/ml auf Eis aufbewahrt und ihre Succinat-Dehydrogenase-Aktivität sofort nach der Isolierung, 20 min und 60 min später bestimmt.

Tabelle 21: Abhängigkeit des Glucagon-Effekts auf die Succinat-Dehydrogenase-Aktivität von der Aufbewahrungsdauer

Aufbewahrungsdauer (min)	Kontrolle (mE/ mg Protein)	Glucagon (mE/ mg Protein)	Zunahme %
0	181.3 ± 18.3	217.0 ± 19.4	20
20	81.0 ± 8.4	144.3 ± 12.0	78
60	59.0 ± 6.5	107.7 ±15.5	84

Die ungewaschenen Saccharose-Mitochondrien wurden wie im Abschnitt 2.5. beschrieben isoliert. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte wie im Abschnitt 2.14. beschrieben. Die Mittelwerte ± SEM sind für 6 Versuche angegeben.

Je länger die Mitochondrien bei 0°C stehengelassen wurden, um so ausgeprägter schien der Hormoneffekt.

Nach 20 min Aufbewahrungsdauer hatte die Kontroll-Aktivität der Succinat-Dehydrogenase um 55% und nach 60 min bereits um 70% abgenommen (Tabelle 21).

Es war jedoch möglich, durch Zusatz verschiedener Substrate die Inaktivierung des Enzyms bei den Kontroll-Mitochondrien während der Aufbewahrung zu verhindern. Tabelle 22 zeigt die Wirkung von 5 mM Succinat, das dem Saccharose-Medium zugegeben wurde. Die Vergleichsmitochondrien wurden unter Zusatz von 10 mM NaCl präpariert. Glucagon-Behandlung bewirkte zwar keine Erhöhung der Succinat-Dehydrogenase-Aktivität mehr in "Succinat-Mitochondrien", aber nach 15 min waren die Enzymaktivitäten sowohl bei den Kontroll- als auch bei den Glucagon-Ratten im Vergleich zu den Ausgangsaktivitäten unverändert.

Die Mitochondrien von 48 h-gehungerten Ratten zeigten die gleiche stabilisierende Wirkung von Succinat wie die gefütterten.

Auch andere Substrate wie 10 mM D,L -3- Hydroxybutyrat, 5 mM ATP, 1 mM Palmityl-Carnitin und 3 mM Ascorbat mit 0.25 mM Tetramethylphenylendiamin hatten eine ähnliche Wirkung auf die Enzymaktivität wie Succinat (Tabelle 22).

Weitere Untersuchungen haben gezeigt, daß die Succinat-Dehydrogenase von eingefrorenen und aufgetauten Mitochondrien beim Stehenlassen bei 0°C nicht inaktiviert wurde. Eine hypoosmotische Behandlung der Mitochondrien verhinderte ebenfalls die Abnahme der Enzymaktivität.

Tabelle 22: Stabilisierende Wirkung von Substraten auf isolierte Mitochondrien von Kontroll- und Glucagon-Ratten während ihrer Aufbewahrung

Substrat	Aufbewahrungsdauer (min)		Succinat-Dehydrogenase-Aktivität (mE/mg Protein) Kontrolle	Glucagon	Zunahme %
10 mM NaCl	0	(n=8)	203.9 ± 5.9	251.5 ± 8.3	23
	15	(n=8)	91.6 ± 11.8	159.5 ± 16.7	74
5 mM Succinat	0	(n=8)	208.9 ± 8.1	238.4 ± 9.6	14
	15	(n=8)	205.1 ± 6.4	242.4 ± 11.9	18
10 mM D,L-3-Hydroxy-	0	(n=5)	215.0 ± 13.1	218.8 ± 20.6	0
butyrat	15	(n=5)	180.8 ± 12.7	208.6 ± 19.1	15
5 mM ATP	0	(n=3)	167.0 ± 22.6	203.7 ± 34.2	22
	15	(n=3)	152.0 ± 19.8	213.0 ± 36.6	40
1 mM Palmity-	0	(n=3)	178.0 ± 24.2	237.5 ± 10.3	33
carnitin	15	(n=3)	173.5 ± 21.0	254.0 ± 15.7	46

Die Glucagon-Behandlung von Ratten ist im Abschnitt 2.3. beschrieben. Die Isolierung der Saccharose - Mitochondrien sowie die Aktivitätsbestimmung der Succinat-Dehydrogenase erfolgte wie in Abschnitt 2.5. bzw. 2.14. angegeben. Es sind die Mittelwerte ± SEM und in Klammern die Anzahl der Präparationen angegeben..

6.4. Einfluss der Testtemperatur auf den Glucagon-Effekt

Die Größe des Glucagon-Effekts auf die Pyruvat-Carboxylase-Aktivität war abhängig von der Testtemperatur. Tabelle 23 zeigt die Enzymaktivitäten bei 25°C und 37°C.

Tabelle 23: Abhängigkeit des Glucagon-Effekts auf die Pyruvat-Carboxylase-Aktivität von der Testtemperatur

Test-Temperatur (°C)	Pyruvat-Carboxylase-Aktivität (nmole CO_2/min/mg Protein)					
	Ungewaschene Mitochondrien			Gewaschene Mitochondrien		
	Kontrolle	Glucagon	Zunahme	Kontrolle	Glucagon	Zunahme
25	4.8 ± 0.6 (n=8)	6.2 ± 0.4	30%	4.2 ± 0.5 (n=6)	5.9 ±0.8	42%
37	6.7 ± 1.0 (n=7)	12.4 ±1.1	84%	4.7 ± 0.9 (n=7)	11.5±1.4	147%

Die Isolierung der Saccharose-Mitochondrien und die Aktivitätsbestimmung der Pyruvat-Carboxylase wurden im Abschnitt 2.5. und 2.13. beschrieben. Es sind die Mittelwerte ± SEM und in Klammern die Anzahl der Präparationen angegeben.

Sowohl die basale Aktivität der Pyruvat-Carboxylase als auch ihre Stimulierung nach Glucagon-Behandlung waren bei einer Testtemperatur von 37°C höher als bei 25°C. Der Hormoneffekt war bei gewaschenen Mitochondrien größer als bei ungewaschenen (Tabelle 23).

IV. DISKUSSION

1. Wirkung von Glucagon auf den hepatischen Succinyl-CoA-Gehalt

Die auffälligste Wirkung des Glucagons auf mitochondriale Metabolitgehalte ist die Abnahme der C_5-Dicarbonsäuren, Glutamat und 2-Oxoglutarat (Ui et al., 1973 ; Siess et al., 1977) um beinahe 80%. Dieser Befund blieb bislang ohne Erklärung, nachdem eine direkte Aktivierung der Glutamat-Dehydrogenase (EC 1.4.1.3) bzw. der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase durch Glucagon nicht nachgewiesen werden konnte (Siess & Wieland, 1978a). Die Berichte über eine Feedback-Hemmung der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase durch Succinyl-CoA kompetitiv zu CoASH (Garland, 1964) veranlaßten, in der vorliegenden Arbeit das Verhalten dieses Metaboliten nach Glucagon-Applikation zu untersuchen. Wie aus dem K_i-Wert von 6.9 µM hervorgeht (Garland, 1964), können bereits geringe Succinyl-CoA-Konzentrationen wirksam den Substratfluß durch die 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase beeinflussen. Änderungen im Succinyl-CoA : CoASH-Verhältnis nach Glucagon könnten somit eine Ursache für die hormonbedingte Beschleunigung des 2-Oxoglutarat-Umsatzes darstellen. Nachdem Messungen über CoASH-Spiegel bereits vorliegen (Siess et al., 1977) und keinen wesentlichen Hormoneinfluß erkennen ließen, wurde in dieser Arbeit das Augenmerk auf das Verhalten von Succinyl-CoA gerichtet.

Untersuchungen an gefriergestoppten Lebern Glucagonbehandelter Ratten zeigten eine 50% Abnahme des Succinyl-CoA ($p < 0.0005$) gegenüber Kontrolltieren (Tabelle 2). In Versuchen mit Hepatozyten wurde sichergestellt, daß diese Abnahme nicht durch extrahepatische Einflüsse des Hormons verursacht wurde. Die in Tabelle 4 aufgeführten Ergebnisse zeigen, daß die Zugabe von Glucagon oder Dibutyryl-cAMP zum

Inkubationsmedium einen signifikanten Abfall des Succinyl-CoA-Gehaltes bewirkt ($p < 0.0125$ bzw. $p < 0.0005$). Der Hormoneffekt entsprach der *in vivo* beobachteten Wirkung. Selbst in Hepatozyten, die mit Lactat vorinkubiert waren und deshalb einen ungewöhnlich hohen Succinyl-CoA-Gehalt aufwiesen, bewirkte Glucagon immer noch die gleiche Nettoabnahme (Tabelle 5).

Studien über die Kinetik der Succinyl-CoA-Abnahme in Hepatozyten machten deutlich, daß der Hormoneffekt nach einer Minute voll ausgeprägt ist (Tabelle 4). Zu diesem Zeitpunkt beträgt die mitochondriale Konzentration von 2-Oxoglutarat mindestens 0.8 mM, wie aus Kompartimentierungsversuchen unter ähnlichen Bedingungen hervorgeht (Siess et al., 1977). Wegen der hohen Affinität der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase zu seinem Substrat (im Schweineherzmuskel beträgt der K_M-Wert 13 µM für 2-Oxoglutarat; Sanadi, 1969), ist daher eine Sättigung des Enzyms mit 2-Oxoglutarat gewährleistet. Demnach kann der Succinyl-CoA-Abfall nicht auf einen bloßen Substratmangel zurückgeführt werden.

Die Möglichkeit einer regulatorischen Rolle von Succinyl-CoA in Mitochondrien ist nicht allein auf die 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase beschränkt. So ist in diesem Zusammenhang bemerkenswert, daß Succinyl-CoA als Inhibitor der Citrat-Synthase (EC 4.1.3.7) kompetitiv zu Acetyl-CoA beschrieben wurde (LaNoue et al., 1972). Aufgrund vorläufiger Untersuchungen zur subzellulären Verteilung ist das gesamte Succinyl-CoA der Leberparenchymzelle gefütterter Ratten in der mitochondrialen Matrix lokalisiert. Demnach beträgt die Konzentration in diesem Kompartiment etwa 200 µM (Tabelle 2). Die Konzentration von Succinyl-CoA für die halbmaximale Hemmung der Citrat-Synthase in Rattenleber wird mit 140 µM angegeben (Smith & Williamson, 1971). Somit könnte der Abfall von 200 µM auf 94 µM unter Glucagon (Tabelle 2) zu einer Beschleunigung des Flußes durch die

Citrat-Synthase beitragen, falls die Oxalacetat-Konzentration nicht limitierend wirkt.

Neben seiner Wirkung auf den Citrat-Zyklus ist auch ein Einfluß des Succinyl-CoA im Zusammenhang mit der Pyruvat-Carboxylase (EC 6.4.1.1) auf die Gluconeogenese denkbar. Aus Untersuchungen von Scrutton (1974) ist bekannt, daß Succinyl-CoA die Pyruvat-Carboxylase aus Hühnerleber mit einem K_i-Wert von 250 µM hemmt. Messungen von Haynes (1972) haben gezeigt, daß die Pyruvat-Carboxylase intakter Rattenlebermitochondrien nur zu 14% aktiv ist, d.h. daß 86% der Aktivität erst nach Extraktion der Pyruvat-Carboxylase gemessen werden können. Wenn dies auch auf die Pyruvat-Carboxylase der Rattenleber zutrifft, ließe die Abnahme von Succinyl-CoA einen fördernden Einfluß auf dieses geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Gluconeogenese erwarten. Durch Regulation des Succinyl-CoA-Spiegels könnte Glucagon demnach die Glucoseneubildung fördern, indem es in zweifacher Hinsicht zur vermehrten Substratbereitstellung beiträgt: einmal durch Verringerung der Hemmwirkung auf die Pyruvat-Carboxylase und zum anderen durch die Beschleunigung des Flußes durch die 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase. Dies eröffnet eine neue Möglichkeit zum Verständnis des Malatanstiegs nach Glucagon, der bisher nur im Zusammenhang mit der allosterischen Aktivierung der Pyruvat-Carboxylase durch Acetyl-CoA und dem erhöhten mitochondrialen ATP:ADP-Quotienten gesehen wurde.

Als Ursache für die Abnahme von Succinyl-CoA kommen verschiedene Möglichkeiten in Betracht. So war es naheliegend, an die Aktivierung Succinyl-CoA verbrauchender Reaktionen durch Glucagon zu denken. Eine dieser Reaktionen betrifft die Succinyl-CoA-Transferase (EC 2.8.3.5), also die CoA-Übertragung von Succinyl-CoA auf Acetoacetat.

Die Succinyl-CoA-Transferase ist ausschließlich in den Mitochondrien lokalisiert und besitzt in der Rattenleber eine geringe Aktivität von 1 E/g Frischgewicht verglichen z.B. mit 35 E/g Frischgewicht in Schafsnieren oder 12 E/g Frischgewicht im Schweineherzmuskel (Hersh & Jecks, 1969). Die Michaelis-Konstanten für die Transferase aus Schweineherzmuskel betragen für Succinyl-CoA 4.2 mM und für Acetoacetat 0.2 mM (Barman, 1969). Falls diese K_M-Werte auch für das Enzym aus Rattenleber zutreffen, so ist das Enzym bei einer Succinyl-CoA-Konzentration von 0.2 mM nicht gesättigt, wohl aber mit Acetoacetat, dessen mitochondriale Konzentration in gehungerten Ratten 4 mM beträgt (Siess et al., 1982b). Da Acetoacetat unter Glucagon abnimmt (Siess et al., 1977), wäre eine Zunahme der Enzymaktivität durch erhöhte Substratbereitstellung nicht zu erwarten. Es ist deshalb wenig wahrscheinlich, daß der Succinyl-CoA-Abfall von einer metabolisch bedingten Steigerung der Succinyl-CoA-Transferase-Aktivität herrührt. Messungen der Transferase-Aktivität im Leberhomogenat bzw. Mitochondrienextrakt Glucagon-behandelter Ratten ließen zudem keinen Hormoneffekt erkennen (Tabelle 6).

Als weitere Succinyl-CoA verbrauchende Reaktion wurde die δ-Aminolaevulinsäure - Synthetase ($\hat{=}$ ALA - Synthetase, EC 2.3.1.37) untersucht, wobei auf pharmakologische Induktion der Enzymaktivität durch z.B. Allylisopropylacetamid verzichtet wurde, um einen möglichen Einfluß von Glucagon besser erkennen zu können. Die Aktivität der ALA-Synthetase im Leberhomogenat 48 h-gehungerter Ratten betrug 0.67 nmol/h/mg Protein (Tabelle 11), wenn das Leberhomogenat mit 10 mM Tris-0.9% NaCl präpariert worden war, verdoppelte sich jedoch, wenn das Homogenat im Mannit-Medium hergestellt wurde (Tabelle 11). Glucagon-behandelte Ratten zeigten gegenüber Kontrolltieren eine Erhöhung der ALA-Synthetase-Aktivität um 30% ($p < 0.005$; Tabelle 12). Der am Ge-

samthomogenat gefundene Hormoneffekt ließ sich auch nach Isolierung der Mitochondrien bestätigen. Hier lag die ALA-Synthetase-Aktivität um 40% höher ($p < 0.025$; Tabelle 13).

Die ALA-Bildung durch Glucagon hat nach der Methode von Sassa et al. (1979) um 18 nmol/h/g Frischgewicht und nach der Methode von Ebert et al. (1970) um 67 nmol/h/g Frischgewicht zugenommen (Tabelle 12). Die Abnahme von Succinyl-CoA in 48 h-gehungerten Ratten beträgt 9 nmol/g Frischgewicht (Tabelle 2). Theoretisch würde die Aktivierung der Synthetase je nach Berechnungsbasis nach 30 bzw. 8 min bei 37°C den beobachteten Abfall von Succinyl-CoA bewirken können. Untersuchungen in Hepatozyten zeigten jedoch, daß die Glucagon-Wirkung auf den Succinyl-CoA-Spiegel bereits nach einer Minute voll ausgeprägt ist (Tabelle 4). Daher erscheint es unwahrscheinlich, daß die Zunahme der ALA-Synthetase-Aktivität nach Glucagon die Ursache für den Abfall von Succinyl-CoA in einer so kurzen Zeit darstellt. Die Untersuchungen wurden daher auf das Verhalten der Succinyl-CoA-Synthetase (EC 6.2.1.4) ausgedehnt.

Eine gluconeogenetisch möglicherweise bedeutsame Funktion der Synthetase-Reaktion liegt in der Bereitstellung von GTP für die mitochondriale Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Reaktion (PEPCK, EC 4.1.1.32). Eine Stimulierung der Synthetase-Reaktion würde daher außer der Abnahme der Succinyl-CoA-Konzentration zugleich den mitochondrialen Anstieg der Phosphoenolpyruvat-Konzentration (Siess et al., 1977) und die Erhöhung des mitochondrialen GTP:GDP-Verhältnisses isolierter Leberzellen (Siess & Wieland, 1979a) unter Glucagon erklären können.

Die Hormonwirkung auf die Synthetase-Aktivität wurde in isolierten Mitochondrien Glucagon-behandelter Ratten nach Extraktion mit Lubrol untersucht. Aufgrund der angegebenen Michaelis-Konstanten für das Rattenleberenzym (Ball & Nishimura, 1980) ist eine Sättigung der Synthetase mit

seinen Substraten in der Leber gewährleistet. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte deshalb bei sättigenden Konzentrationen von GTP, CoASH und Succinat. Es stellte sich heraus, daß die Aktivität der Mitochondrienextrakte aus Kontroll- und Glucagon-behandelten Tieren nicht unterschiedlich war, sondern 140 mE/mg Protein betrug (Tabelle 7). Auf das Leberfrischgewicht umgerechnet entspricht dies 9 E/g. Mit Dibutyryl-cAMP inkubierte Hepatozyten zeigten gegenüber Kontrollzellen ebenfalls keinen Unterschied in der Enzymaktivität (Tabelle 8). Nachdem Glucagon die Gesamtaktivität der Succinyl-CoA-Synthetase nicht veränderte, wurde die Möglichkeit einer allosterischen Regulation des Enzyms in Betracht gezogen.

Über mögliche Effektoren der Synthetase existieren in der Literatur keine Angaben. Daher wurde die Wirkung derjenigen Metabolite auf die Synthetase-Aktivität geprüft, deren Konzentration von Glucagon beeinflußt wird, insbesondere Glutamat und 2-Oxoglutarat. Glutamat, in einer Konzentration bis 10 mM, hatte keinen Einfluß auf die Enzymaktivität, während 2-Oxoglutarat ab 5 mM eine Hemmung verursachte (Tabelle 9). Diese Beobachtung ist wahrscheinlich ohne physiologische Bedeutung, da bei einer mitochondrialen Konzentration von 3 mM (Siess et al., 1977), keine wesentliche Desaktivierung zu erwarten ist. Im Falle von ATP wurde bei einer Konzentration von 0.1-0.4 mM eine 20% Steigerung der Enzymaktivität beobachtet (Tabelle 9). In der intakten Leberzelle beträgt die mitochondriale ATP-Konzentration aber bereits 17 mM, so daß der ATP-Anstieg durch Glucagon um 25% wohl ohne Einflußauf die Synthetase sein dürfte. Die Befunde solcher Untersuchungen lassen jedoch nur eine beschränkte Aussage zu, da isolierte Enzyme zumal unter dem Einfluß von Detergentien, sich Effektoren gegenüber anders verhalten können, als in der intakten Zelle.

Im Zusammenhang mit einer möglichen Aktivitätserhöhung der Succinyl-CoA-Synthetase verdient die Tatsache besondere Bedeutung, daß nach Glucagon der Gehalt an anorganischem Phosphat im Cytosol ansteigt (Siess et al., 1982a). Da die Substratkettenphosphorylierung auf der Stufe der Succinyl-CoA-Synthetase P_a in stöchiometrischen Mengen benötigt, eröffnet dieser Befund die Möglichkeit, daß durch erhöhte Bereitstellung von P_a an die Mitochondrien Glucagon die P_a-verbrauchende Synthetase-Reaktion begünstigt, also zu einem erhöhten Umsatz von 2-Oxoglutarat und schließlich Malat führen könnte. Die damit verbundene Steigerung des GTP-Angebots könnte demnach im Zusammenhang mit der Erhöhung des mitochondrialen Phosphoenolpyruvats gesehen werden. Aufgrund dieser Überlegungen und der gefundenen Anhäufung von P_a in isolierten Mitochondrien Glucagon-behandelter Ratten (Prpić et al., 1978 ; Hughes & Barritt, 1978) erschien es lohnenswert, den möglichen Einfluß des cytosolischen P_a auf den mitochondrialen Stoffwechsel zu untersuchen. Dazu wurden Modellexperimente mit isolierten Mitochondrien durchgeführt, wobei deren Metabolitgehalte nach Inkubation mit steigenden P_a-Konzentrationen gemessen wurden.

Die Ergebnisse von Tabelle 14 und 15 zeigen deutlich, daß in Übereinstimmung mit dieser Vorstellung sowohl der Abbau von 2-Oxoglutarat als auch die Bildung von Malat und Phosphoenolpyruvat mit steigendem Angebot von P_a im Inkubationsmedium zunahmen. Das Verhalten des Succinyl-CoA-Gehaltes war von den experimentellen Bedingungen bestimmt. Unter hohem ADP-Angebot an die ATP-ADP-Translokase (Tabelle 14) ergab die Succinyl-CoA-Messung bereits ohne exogenen P_a-Zusatz so niedrige Werte, daß eine weitere Abnahme nicht mehr feststellbar war. In den Experimenten mit einem ADP-regenerierenden System (Glucose/Hexokinase) wurde jedoch ein Abfall von Succinyl-CoA beobachtet ähnlich zur Situa-

tion unter Glucagon (Tabelle 15). Die Wirkung von P_a war dabei unabhängig von der jeweiligen intramitochondrialen ATP-Konzentration.

Die Ergebnisse aus den Experimenten mit Phosphat-Zusatz waren ein erster Hinweis auf die besondere Rolle des anorganischen Phosphates in der hormonellen Regulation des Citrat-Zyklus und der Gluconeogenese durch Glucagon. Während dieser Experimente stellte sich außerdem heraus, daß auch eine andere Glucagon-abhängige Mitochondrienfunktion, nämlich die Citrullin-Bildung, ebenfalls von der exogenen P_a-Konzentration betroffen ist. Bei einer P_a-Konzentration vom 3 mM betrug der Citrullin-Gehalt das 13-fache des Wertes ohne P_a-Zusatz (Tabelle 17).

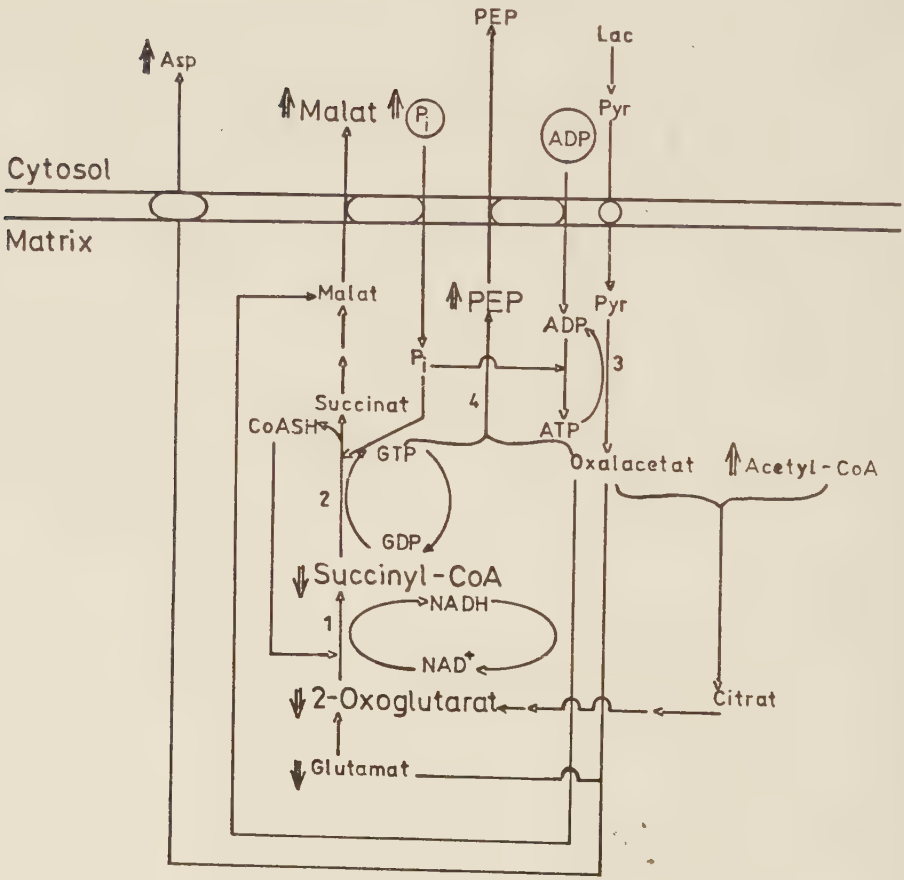
Die Möglichkeit, daß wegen des gemeinsamen Transportes von P_a und Ca^{2+} (Wehrle & Pedersen, 1979) die beobachteten Wirkungen von P_a indirekter Natur seien und durch Vermittlung von Ca^{2+} zustande kämen, wurde gesondert untersucht. Dabei wurde festgestellt, daß selbst in Gegenwart von 1 mM Ruthenium-Rot, einem Inhibitor des Ca^{2+}-Transporters, der P_a-Einfluß auf die Metabolitgehalte unverändert blieb (Tabelle 16). Somit scheint eine wesentliche Beteiligung von Ca^{2+} nicht wahrscheinlich zu sein.

Die Erhöhung der Citrullin-Bildung, die Beschleunigung des 2-Oxoglutarat-Abbaus, zusammen mit der Anhäufung von Phosphoenolpyruvat und Malat und der Abnahme von Succinyl-CoA, wie sie in diesen Experimenten nach Erhöhung des P_a-Angebots an die Mitochondrien beobachtet wurden, sind Effekte, die im mitochondrialen Kompartiment intakter Hepatozyten unter Glucagon auftreten. Dabei ist besonders die Tatsache bemerkenswert, daß die Erhöhung des P_a-Spiegels von 3.4 µmol/g Trockengewicht auf 5.0 µmol/g Trockengewicht (Siess et al., 1982a), die das Hormon im Cytosol intakter

Leberzellen bewirkt, auch an den isolierten Mitochondrien in der Lage war, Veränderungen im Metabolitmuster analog zu Glucagon hervorzurufen. Diese Befunde legen den Schluß nahe, daß die Ursache einer Reihe von Glucagon-Wirkungen auf den mitochondrialen Stoffwechsel in einer erhöhten Bereitstellung von P_a zu sehen ist.

In Ergänzung zu den bereits erwähnten Wirkungen ließe sich auf dieser Basis auch die Erhöhung des mitochondrialen Redoxgrades der Pyridinnukleotide nach Glucagon als Folge des P_a-stimulierten 2-Oxoglutarat-Succinat-Abbaus verstehen. Die Steigerung des mitochondrialen Acetyl-CoA-Spiegels und der Ketonkörper-Bildung nach Glucagon könnten dann wohl als Hemmung des Citrat-Zyklus durch relativen Anstau von NADH und die damit verbundene Reduktion von Oxalacetat zu Malat aufgefaßt werden.

Abbildung 7: Wirkung des Glucagons über erhöhtes P_a - und ADP-Angebot auf den mitochondrialen Stoffwechsel



Legende zu Abbildung 7:

Abbildung 7 zeigt eine schematische Darstellung des vorgeschlagenen Wirkungsmechanismus des Glucagons auf den Mitochondrienstoffwechsel über ein erhöhtes P_a - und ADP-Angebot an die Mitochondrien. Dabei wurde das erhöhte ADP-Angebot auf die beschriebene Hemmung der Pyruvatkinase durch Glucagon (Feliu et al., 1976) zurückgeführt.
Die Glucagon-Wirkung auf die Metabolitgehalte sind durch Pfeile gekennzeichnet:

⇓= Abnahme ⇑= Zunahme

Abkürzungen:

Asp = Aspartat
Lac = Lactat
PEP = Phosphoenolpyruvat
Pyr = Pyruvat
PK = Pyruvatkinase (EC 2.7.1.40)
(1) = 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase (EC 1.2.4.2)
(2) = Succinyl-CoA-Synthetase (EC 6.2.1.4)
(3) = Pyruvat-Carboxylase (EC 6.4.1.1)
(4) = PhosphoenolPyruvat-Carboxykinase (EC 4.1.1.32)

2. Zur Frage der Funktionserhaltung isolierter Mitochondrien nach Glucagon

Die in dieser Arbeit beschriebenen Befunde zur Wirkung des Glucagons auf mitochondriale Metabolite wurden an gefriergestoppter Leber oder isolierten Hepatozyten erhoben. Seit 1969 erschien eine Anzahl von Arbeiten, die über eine Hormonwirkung an isolierten Lebermitochondrien nach Glucagon-Behandlung intakter Ratten oder Hepatozyten berichteten. Diese Hormonwirkung betraf unter anderem die Erhöhung der Pyruvat-Carboxylierung (Adam & Haynes, 1969; Yamazaki & Haynes, 1975 ; Titheradge & Coore, 1976a,b), die Stimulierung der Status-3-Atmung (Yamazaki, 1975 ; Siess & Wieland, 1979b) und die Zunahme der Citrullin-Synthese (Yamazaki & Graetz, 1977). Diese Beobachtungen führten zu dem Schluß, daß isolierte Mitochondrien für das Studium des hormonellen Wirkungsmechanismus ein geeignetes experimentelles Modell darstellen. Dabei blieb aber unbeachtet, daß die Mitochondrien während der Isolierung vielfältigen Einflüssen ausgesetzt sind, die möglicherweise dazu führen könnten, daß mit isolierten Mitochondrien erhobene Befunde nicht mit der in situ Wirkung des Glucagons gleichgestellt werden können. Es wäre z.B. denkbar, daß die Wahl des Isolationsmediums, dessen Osmolarität, die Aufbewahrungsbedingungen und die Proteinkonzentration der Mitochondrien, ferner die Anwesenheit von Substraten im Isolationsmedium die Erhaltung des mitochondrialen Funktionszustands entscheidend beeinflussen. Einschlägige Experimente zur Klärung dieser Frage wurden in der vorliegenden Arbeit unternommen.

Die Befunde über die Abhängigkeit der Glucagon-Wirkung vom Isolationsmedium waren der erste Hinweis darauf, daß isolierte Mitochondrien, wie sie in den einschlägigen Untersuchungen seit 1969 zum Einsatz kamen (Adam & Haynes, 1969 ; Bryla et al., 1977 ; Titheradge et al., 1978; Siess &

Wieland, 1978a ; Chan et al., 1979 ; Halestrap, 1982), wohl nicht in der Lage sind, die in der Zelle stattfindenden hormonellen Prozesse unverfälscht widerzuspiegeln. War doch die Wahl zwischen Saccharose- und Mannit-Medium zur Mitochondrienpräparation von entscheidender Bedeutung für die Größe des Hormoneffekts (Tabelle 18). Dies deshalb, weil Kontrollmitochondrien, die in Mannit-Medium präpariert wurden, deutlich höhere Aktivitäten bezüglich Status-3-Atmung, der Succinat-Dehydrogenase und der 2-Oxoglutarat-Decarboxylierung zeigten als Saccharose-Mitochondrien (Siess et al., 1981) und dementsprechend die scheinbare Stimulierung durch Glucagon nur gering war.

Die verschiedenen Wirkungen von Isolationsmedien auf der Mono- bzw. Disaccharidbasis auf mitochondriale Funktionen wurden in zwei kürzlich erschienenen Arbeiten ausführlich dargelegt (Siess, 1983a,b). In diesen Untersuchungen zeigen die nach üblicher Art mit 0.3 M Saccharose hergestellten Mitochondrien signifikant niedrigere Geschwindigkeiten der Status-3-Atmung, Pyruvat-Carboxylierung, ATP-Hydrolyse und Thiolgruppenproduktion als Mitochondrien, die aus denselben Lebern mit Mannit präpariert worden waren. Dabei wurde auch gefunden, daß die Zugabe von 2 mM Kaliumphosphat zum Saccharose-Medium (Siess, 1983a) zu beinahe ebenso hohen Aktivitäten führt, wie sie mit Mannit beobachtet werden. Dies verdient besondere Erwähnung, weil Mitochondrien nach Glucagon-Vorbehandlung isoliert einen erhöhten P_a-Gehalt aufweisen (Hughes & Barritt, 1978 ; Barritt et al., 1978). Somit besteht die Möglichkeit, daß die scheinbare Erhöhung der Atmungs- und Enzymaktivitäten gegenüber Kontrollmitochondrien auf den unter Glucagon erhöhten mitochondrialen P_a-Gehalt zurückzuführen sind. In diesem Zusammenhang sind auch die Ergebnisse von Hamman & Haynes (1983) zu sehen, die in Anwesenheit von Kaliumphosphat im Saccharose-Medium eine Stimulierung der ATPase-Aktivität und der CO_2-Fixierung in isolierten Rattenlebermitochndrien beobachteten.

Die Autoren schlossen jedoch aus ihren Befunden, daß P_a in der Lage ist, den Glucagon-Effekt nachzuahmen, ohne die Beziehung zwischen Glucagon und dem erhöhten P_a-Angebot näher zu erläutern.

Weitere Hinweise auf die zumindest teilweise artefizielle Natur der Glucagon-Effekte in isolierten Mitochondrien lieferten die Experimente, die eine Abhängigkeit der Hormonwirkung von der Anzahl der Mitochondrienwaschungen (Tabelle 19) und von den Bedingungen der Mitochondrienaufbewahrung (Tabelle 20 und 21) deutlich machten. Diese Befunde zusammen mit der Tatsache, daß nach Substratzusatz (Succinat, 3-Hydroxybutyrat, ATP, Palmitylcarnitin, Ascorbat) zum Isolationsmedium durch Erhaltung der Kontrollaktivitäten ebenfalls nur geringe Glucagon-Effekte an den isolierten Mitochondrien auftraten, legen den Schluß nahe, daß die Aktivierung mitochondrialer Funktionen durch Glucagon nicht wie bisher angenommen an den isolierten Organellen studiert werden kann.

Möglicherweise muß der Glucagon-Effekt auf die Citrullin-Bildung von dieser Behauptung ausgenommen werden, denn aufgrund der Arbeit von Verhoeven et al. (1982) sieht es so aus, als ob die hormonelle Regulation dieser mitochondrialen Funktion durch einen anderen Mechanismus erfolgte als die bisher angesprochenen Funktionen. Verhoeven et al. untersuchten die Citrullin-Synthese in Lebermitochondrien Glucagon-behandelter Ratten nach Isolierung in Mannit-Medium. Während die Citrullin-Bildung in Glucagon-Mitochondrien signifikant erhöht war, zeigte die Status-3-Atmung keinen Hormoneffekt. Die Autoren schließen aus ihren Ergebnissen, daß die Zunahme der Citrullin-Synthese eine echte Aktivierung der Mitochondrien bedeutet und auf eine direkte Wirkung des Glucagons auf die Carbamyl-P -Synthetase zurückzuführen ist. Hier bleibt allerdings die Frage offen, ob während der Inkubation mit Glucagon nicht eine vermehrte

mitochondriale Speicherung von N-Acetylglutamat stattgefunden hat und wegen der geringen Permeation dieses Metaboliten durch die innere Mitochondrienmembran, wenigstens teilweise noch nach der Isolierung erhalten geblieben war. Dadurch könnte es über eine Aktivierung der Carbamyl-P - Synthetase zur Steigerung der Citrullin-Bildung kommen. Es scheint also nicht einmal dann, wenn eine augenscheinliche mitochondriale Aktivitätssteigerung eindeutig nachweisbar ist, möglich zu sein, auf die Identität zwischen dem an den isolierten Mitochondrien und dem in den intakten Hepatozyten wirksamen Mechanismus zu schliessen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur Persistenz der Glucagon-Wirkung an isolierten Mitochondrien lassen sich dahingehend interpretieren, daß Glucagon eine Stabilisierung der Mitochondrien gegen Isolationseinflüssen bewirkt. Der Mechanismus dieser Stabilisierung ist noch unbekannt. Die Beobachtungen, daß Chloroquin und Cinchocain, zwei Phospholipase-Inhibitoren, einen Glucagon-ähnlich stabilisierenden Effekt während der Mitochondrienisolierung entfalten, lenkte die Spekulation auf eine Phospholipasenhemmung durch Glucagon (Siess et al., 1981). Phospholipidanalysen von Mitochondrien aus Kontroll- und Glucagon-Zellen, die mit ^{14}C-markiertem Cholin oder Äthanolamin vorinkubiert worden waren, ergaben jedoch bei der Dünnschicht-Chromatographischen Analyse keinen erkennbaren Unterschied im Lipidmuster, der für diese Annahme gesprochen hätte (Siess et al., 1981).

Im Gegensatz zur Vorstellung der Mitochondrienstabilisierung durch Glucagon haben andere Autoren neuerdings versucht das Konzept der persistierenden Mitochondrienaktivierung durch zusätzliche Experimente zu stützen. Zum Nachweis der direkten Aktivierung von Mitochondrien durch Glucaon wählten Allan et al. (1983) Filipin zur Behandlung von Hepatozyten, um deren Plasmamembran für Substrate der

Pyruvat-Carboxylase durchlässig zu machen. Damit glaubten die Autoren in situ Bedingungen zu schaffen, um die mitochondriale Pyruvat-Carboxylierung ohne vorausgehende Mitochondrienisolierung messen zu können. Nach ihren Befunden zeigten Filipin-Hepatozyten bereits einen Glucagon-Effekt auf die CO_2-Fixierung, der allerdings deutlich unter den Werten isolierter Mitochondrien lag. Dennoch glaubten die Autoren damit gezeigt zu haben, daß die erhöhte Fähigkeit zur CO_2-Fixierung isolierter Mitochondrien kein Präparationsartefakt sein könne, sondern bereits an den durchlässig gemachten Zellen zu demonstrieren sei. Erhebliche Zweifel an der Stichhaltigkeit dieser Argumentation erschien jedoch angebracht, da die Pyruvat-Carboxylase-Messungen der Filipin-Hepatozyten im 0.3 M Saccharose-Medium durchgeführt wurden. Nachdem gezeigt worden ist, daß 0.3 M Saccharose im Gegensatz zu 0.3 M Mannit eine erhebliche Abnahme des mitochondrialen Wasserraums und zugleich der Pyruvat-Carboxylierung und der ATPase-Aktivität bewirkt (Siess, 1983b), erscheint es durchaus möglich, daß dieser Effekt der Saccharose auf die Mitochondrien bereits in Filipin-Hepatozyten zum Tragen kommt und die Organellen von Kontrollzellen stärker betrifft als diejenigen von Glucagon-stimulierten Hepatozyten.

In einer kürzlich erschienenen Arbeit berichten Jensen et al. (1983), daß die Glucagon-Wirkung auf die Status-3-Atmung, die Pyruvat-Carboxylierung und die Citrullin-Bildung bereits in Leberrohhomogenaten feststellbar sei. Dabei wurden mit 0.3 M Saccharose die gleichen Werte erhalten wie mit 0.15 M KCl als Isolationsmedium. Damit glaubten die Autoren gezeigt zu haben, daß den Hormoneffekt kein Präparationsartefakt sein könne. Hierzu ist kritisch anzumerken, daß die Proteinkonzentration die Größe des Hormoneffekts wesentlich beeinflussen kann (Tabelle 20). So wurden z.B. bei 20 mg mitochondriales Protein/ml erheblich

geringere Kontrollaktivitäten von Succinat-Dehydrogenase gemessen als z.B. bei 50 mg/ml. Dafür fiel die scheinbare Glucagon-Stimulierung bei 20 mg mitochondriales Protein/ml höher aus als bei 50 mg/ml. In den Untersuchungen von Jensen et al. betrug der mitochondriale Proteinanteil in den Rohhomogenaten nur 6 mg/ml. Es scheint demnach nicht ausgeschlossen zu sein, daß auch in der Arbeit von Jensen et al. die Kontrollpräparationen von einem größeren Aktivitätsverlust betroffen sind als die Rohhomogenate von Glucagon exponierten Hepatozyten. Bezüglich des Zeitfaktors bedarf die Tatsache besonderer Erwähnung, daß der Aktivitätsverlust der Kontrollmitochondrien nach Proteinverdünnung bereits 10-15 Minuten deutlich ausgeprägt war (Tabelle 21), also in einem Zeitraum, den auch die Herstellung und Verwendung eines Rohhomogenats mindestens beansprucht.

Zusammenfassend muß festgestellt werden, daß die Auffassung, wonach Glucagon-Wirkung an isolierten Mitochondrien die Hormonwirkung in der intakten Leberzelle wirderspiegelt, experimentell nicht befriedigend belegt ist. Nach den Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit sieht es so aus, als ob es sich um eine scheinbare Stimulation der Mitochondrien handelt, die von einer relativ stärkeren Aktivitätsabnahme der Kontrollmitochondrien während der Präparation hervorgerufen wird. Dies beinhaltet, daß die Mechanismen, über die Glucagon eine echte Funktionssteigerung in der intakten Zelle bewirkt, andere sind als diejenigen, die eine scheinbare Funktionssteigerung an isolierten Mitochondrien verursachen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit stellt einen Beitrag zum Verständnis der Glucagon-Wirkung auf den Stoffwechsel von Lebermitochondrien dar.

Im ersten Teil sind die Untersuchungen insbesondere auf die Erklärung des erhöhten 2-Oxoglutarat- und Glutamat-Abfalls nach Glucagon ausgerichtet. Diesbezüglich konnten folgende Befunde erhoben werden:

1. Succinyl-CoA, ein Inhibitor der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase, fällt nach Glucagon-Behandlung intakter Ratten im gefriergestoppten Lebergewebe um 50% ab. Dieser Befund konnte auch an isolierten Hepatozyten nach Inkubation mit Glucagon erhoben werden.
2. Der Abfall von Succinyl-CoA wird nicht durch Aktivierung der Succinyl-CoA-Transferase oder der Succinyl-CoA-Synthetase verursacht. Hingegen wurde eine Aktivitätssteigerung der δ-Aminolaevulinsäure-Synthetase um 40% beobachtet. Dadurch kann der Abfall von Succinyl-CoA jedoch nicht erklärt werden.
3. Die Erhöhung des P_a-Angebots an isolierten Mitochondrien ruft in ihrem Metabolitmuster Veränderungen hervor, wie sie in Mitochondrien intakter Hepatozyten nach Glucagon gefunden werden. Die Möglichkeit, daß Glucagon den C_5-Dicarbonsäurestoffwechsel über vermehrtes P_a-Angebot an die Mitochondrien beeinflußt wird diskutiert.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit einer kritischen Überprüfung der Interpretation von Glucagon-Effekten an isolierten Mitochondrien. Dabei ergab sich:

1. Kontrollmitochondrien aus 0.3 M Saccharose zeigen eine niedrigere 2-Oxoglutarat-Decarboxylierungsrate und Succinat-Dehydrogenase-Aktivität als Mannit-Mitochondrien. Dadurch erscheint die Glucagon-Stimulierung der Saccharose-Mitochondrien relativ höher.
2. Ungewaschene Mitochondrien zeigen höhere Kontrollaktivitäten der Succinat-Dehydrogenase, der Pyruvat-Carboxylase und der Entkoppler-abhängigen ATPase als gewaschene Mitochondrien. Der Glucagon-Effekt erschien bei gewaschenen Mitochondrien daher ausgeprägter.
3. Die Größe des Hormoneffekts wird von der Proteinkonzentration der Mitochondrien beeinflußt. Bei 20 mg Protein/ml werden sehr viel niedrigere Kontrollaktivitäten von Succinat-Dehydrogenase gemessen als bei 50 mg/ml. Die Glucagon-Stimulierung liegt bei 20 mg/ml entsprechend höher.
4. Mitochondrien mit einer Proteinkonzentration von 20 mg/ml verlieren innerhalb einer Stunde 1/3 ihrer Succinat-Dehydrogenase-Aktivität, so daß die scheinbare Glucagon-Stimulierung in diesem Zeitraum zunimmt.
   Der Aktivitätsverlust der Kontrollmitochondrien kann durch Zusatz von 5 mM Succinat, 5 mM ATP, 10 mM D,L-3-Hydroxybutyrat, 1 mM Palmitylcarnitin bzw. 3 mM Ascorbat verhindert werden.
5. Der Glucagon-Effekt auf die Pyruvat-Carboxylase ist Temperatur abhängig. Bei 37°C liegt die Stimulierung infolge niedrigerer Kontrollaktivitäten scheinbar höher als bei 25°C.
6. Die Befunde deuten daraufhin, daß die Glucagon-Wirkung auf die oben genannten mitochondrialen Funktionen in einer Stabilisierung und nicht in einer echten, bleibenden Aktivierung der Mitochondrien besteht.

VI. ABKÜRZUNGEN

cAMP	Adenosin 3':5'-monophosphat
E	Einheit (µmol/min)
MOPS	N-Morpholino-3-propansulfonsäure
P_a	anorganisches Phosphat
S.E.M.	Standard error of mean
TES	N-tris(hydroxymethyl)methyl-2-amino-äthan-sulfonsäure
Tram	Triäthanolamin
UpM	Umdrehung pro Minute

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Adam, P.A.J. & Haynes, R.C., Jr. (1969) J.Biol.Chem. 244, 6444-6450

Allan, E.H., Chrisholm, A.B. & Titheradge, M.A. (1983) Biochem.J. 12, 417-426

Arrigoni, O. & Singer, T.P. (1962) Nature 193, 1256-1258

Ball, D.J. & Nishimura, J.S. (1980) J.Biol.Chem. 255, 10805-10812

Barman, T.E. (1969) Enzyme Handbook, Springer Verlag, Berlin

Barritt, G.J., Thorne, R.F.W. & Hughes, B.P. (1978) Biochem.J. 172, 577-585

Beisenherz, G., Boltze, H.J., Bücher, T., Czok, R., Garbade, K.H., Meyer-Arend, E. & Pfleiderer, G. (1953) Z.Naturforsch. 8b, 555-577

Bergmeyer, H.U. & Bernt, E. (1974) in: Methoden der Enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H.U., Ed.)Band 2, 1624-1627, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstrasse

Bernt, E. & Bergmeyer, H.U. (1974) in: Mehtoden der Enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H.U., Ed.) Band 2, 1749-1753

Berry, M.N. & Friend, D.S. (1969) J.Cell Biol. 43, 506-520

Bolender, R.P. & Weibel, E.R. (1973) J.Cell Biol. 56, 746-751

Boyde, T.R.C. & Rahmatullah, M. (1980) Anal.Biochem. 107, 424-431

Bryła, J., Harris, E.J. & Plumb, J.A. (1977) FEBS Lett. 80, 443-448

Cha, S. (1969) in: Methods in Enzymology (Lowenstein,J.M., Ed.) Band 13, 62-69, Academic Press, New York

Chan, T.M., Bacon, C.B. & Hill, S.H. (1979) J.Biol.Chem. 254, 8730-8732

Chen, R.F. (1967) J.Biol.Chem. 242, 173-181

Christiansen, R., Borreback, B. & Bremer, J.(1976) FEBS Lett. 62, 313-317

Cornell, N.W.,Lund, P., Hems, R. & Krebs, H.A. (1973) Biochem.J. 134, 671-672

Cornell, N.W., Lund, P. & Krebs, H.A. (1974) Biochem.J. 142, 327-337

Czok, R. & Lamprecht, W. (1974) in: Methoden der Enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H.U., Ed.) Band 2, 1491-1496, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstrasse

Decker, K. (1955) Dissertation, Universität München

Decker, K. (1959) Aktivierte Essigsäure (Enke, F., Ed.) Stuttgart

Decker, K. (1974) in: Mehtoden der Enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H.U., Ed.) Band 2, 2050-2053, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstrasse

Ebert, P.S., Tschudy, D.P., Choudhry, J.N. & Chirigos, M.A. (1970) Biochim.Biophys.Acta 208, 236-250

Edwards, M.R., Singh, M. & Tubbs, P.K. (1973) FEBS Lett.37, 155-158

Exton, J.H. & Park, C.R. (1969) J.Biol.Chem. 244, 1424-1433

Feliu, J.E., Hue, L. & Hers, H.-G. (1976) Proc.Natl.Acad. Sci. USA 73, 2762-2766

Garland, P.B. (1964) Biochem.J. 92, 10C-12C

Guynn, R.W., Veloso, D. & Veech, R.L. (1972) Anal.Biochem. 45, 277-285

Halestrap, A.P. (1982) Biochem.J. 204, 37-47

Hamman, H.C. & Haynes, R.C., Jr. (1983) Biochim.Biophys. Acta 724, 241-250

Haynes, R.C., Jr. (1972) in: Energy Metabolism and the Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria (Mehlman, M.A. & Hanson, R.W., Eds) 239-253 Academic Press, New York

Hersh, L.B. & Jecks, W.P. (1969) in: Methods in Enzymology (Lowenstein, J.M., Ed.), Band 13, 75-81, Academic Press, New York

Hughes, B.P. & Barritt, G.J. (1978) Biochem.J. 176, 295-304

Jaworek, D., Gruber, W. & Bergmeyer, H.U. (1974) in: Methoden der Enzymatischen Analyse(Bergmeyer,H.U.,Ed.) Band 2, 2178-2181, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstrasse

Jensen, C.B., Sistare, F.D., Hamman, H.C. & Haynes, R.C.,Jr. (1983) Biochem.J. 210, 819-827

Keyser, J.W. & Vaughn, J. (1949) Biochem.J. 44, 22

Klingenberg, M. & Pfaff, E. (1966) in: Regulation of Mitochondrial Metabolism (Tager, J.M., Papa, S., Quagliariello, E. & Slater, E.C., Eds.) 180-201, Elsevier, Amsterdam

Krebs, H.A. & Henseleit, K. (1932) Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 210, 33-66

Lamprecht,W. & Trautschold, I. (1974) in: Methoden der Enzymatischen Analyse (Bergmeyer,H.U.,Ed.) Band 2 2151-2160, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstrasse

LaNoue, K.F., Bryla, J. & Williamson, J.R. (1972) J.Biol. Chem. 247, 667-679

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) J.Biol.Chem. 193, 256-257

Möllering, H. (1974) in: Methoden der Enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H.U., Ed.) Band 2, 1636-1639, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstrasse

Müller, E. (1935) Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 237, 35-39

Prpić, V., Spencer, T.L. & Bygrave, F.L. (1978) Biochem.J. 176, 705-714

Ross, B.D. (1972) Perfusion Techniques in Biochemistry, Clarendon Press, Oxford

Sanadi, D.R. (1969) in: Methods in Enzymology (Lowenstein, J.M., Ed.) Band 13, 53-55), Academic Press, New York

Sassa, S., Kappas, A., Bernstein, S.E. & Alvares, P.A. (1979) J.Biol.Chem. 254, 729-735

Schimassek, H. & Mitzkat, H.J. (1963) Biochem.Z. 337, 510-518

Schmidt, E. (1974) in: Methoden des Enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H.U., Ed.) Band 1, 689-696, Verlag Chemie Weinhein/Bergstrasse

Scholz, R. & Bücher, T. (1965) in: Control of Energy Metabolism (Chance, B., Estabrook, R.W. & Williamson, J.R., Ed.) 393- 414, Academic Press, New York

Scrutton, M.C. (1974) J.Biol.Chem. 249, 7057-7067

Sestoft, L. & Bartels, P.D. (1981) in: Short-Term Regulation of Liver Metabolism (Hue, L. & Van de Werve, Eds.) Elsevier/North-Holland, Biomedical Press

Sharp, J.A. & Edwards, M.R. (1978) Biochem.J. 173, 759-765

Siess, E.A., Brocks, D.G. & Wieland, O.H. (1976) FEBS Lett. 69, 265-271

Siess, E.A., Brocks, D.G., Lattke, H.K. & Wieland, O.H. (1977) Biochem.J. 166, 225-235

Siess, E.A. & Wieland, O.H. (1978a) FEBS Lett. 93, 301-306

Siess, E.A., Brocks, D.G. & Wieland,O.H. (1978b) Biochem.J. 172, 517-521

Siess, E.A. & Wieland, O.H. (1979a) Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 360, 1677-1681

Siess, E.A. & Wieland, O.H. (1979b) FEBS Lett. 101, 277-281

Siess, E.A. & Wieland, O.H. (1980) Eur.J.Biochem. 110, 203-210

Siess, E.A., Fahimi, F.M. & Wieland, O.H. (1981) Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 362, 1643-1651

Siess, E.A., Brocks, D.G. & Wieland, O.H. (1982a) in: Metabolic Compartmentation (Sies, H., Ed.) 235-257, Academic Press, New York

Siess, E.A.,Kientsch -Engel, R.I. & Wieland, O.H. (1982b) Eur.J.Biochem. 121, 493-499

Siess, E.A. (1983a) Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 364, 279-290

Siess , E.A. (1983b) Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem., 364, 835-838

Smith, C.M. & Williamson, J.R. (1971) FEBS Lett. 18, 35-38

Smith, C.M., Bryła , J., Damon, S., LaNoue,K.F.& Williamson, J.R. (1973) Analyt.Biochem. 51, 408-420

Struck, E., Ashmore, J. & Wieland, O. (1965) Biochem.Z., 343, 107-110

Sutherland, E.W. & Cori, C.F. (1957) J.Biol.Chem, 182, 531

Titheradge, M.A. & Coore, H.G. (1976a) FEBS Lett. 63, 45-50

Titheradge, M.A. & Coore, H.G. (1976b) FEBS Lett. 71, 73-78

Titheradge, M.A., Binder, S.B., Yamazaki, R.K. & Haynes, R.C., Jr. (1978) J.Biol.Chem. 253, 3357-3360

Ui, M., Exton, J.H. & Park, C.R. (1973) J.Biol.Chem, 248, 5350-5359

Van Schaftingen, E., Hue, L. & Hers,H.G. (1980a) Biochem.J. 192, 887-895

Van Schaftingen, E., Hue, L. & Hers,H.G. (1980b) Biochem.J. 192, 897-901

Verhoeven, A.J., Hensgens, H.E.S.J., Meijer, A.J. & Tager, J.M. (1982) FEBS Lett. 140, 270-272

Wehrle, J.P. & Pedersen, P.L. (1979) J.Biol.Chem. 254, 7269-7275

Weiner, M.W. & Lardy, H.A. (1974) Arch.Biochem.Biophys. 162, 568-577

Whiting, M.J. & Elliot, W.H. (1972) J.Biol.Chem 247, 6818-6826

Williamson, J.R., Browning, E.T., Thurman, R.G. & Scholz,R. (1969) J.Biol.Chem. 244, 5055-5064

Williamson, J.R. & Corkey, B.E. (1969) in: Methods in Enzymology, (Lowenstein, J.M., Ed.) Band 13, 434-513 Academic Press, New York

Williamson, D.H., Bates, M.W., Page, M.A. & Krebs, H.A. (1971) Biochem.J. 121, 41-47

Williamson, J.R. (1974) in: Methoden der Enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H.U., Ed.) Band 2, 1661-1660 Verlag Chemie, Weinheim/Bergstrasse

Wollenberger, A., Krause, E.G. & Wahler, B.E. (1958) Naturwissenschaften 45, 294

Yamazaki, R.K. & Haynes, R.C., Jr. (1975) Arch.Biochem. Biophys. 166, 575-583

Yamazaki, R.K. (1975) J.Biol.Chem. 250, 7924-7930

Yamazaki, R.K. & Graetz, G.S. (1977) Arch.Biochem.Biophys. 178, 19-25

Zahlten, R.W., Stratman, F.W. & Lardy, H.A. (1973) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 70, 3213-3218

Zammit, V.A., Beis, A. & Newsholm, E.A. (1979), FEBS Lett. 103, 212-215

Zuurendonk, P.F. & Tager, J.M. (1974) Biochim.Biophys.Acta 333, 393-399

LEBENSLAUF

Malak Fahimi - Hamidi

21.3.1953	geboren in Teheran
1958-1964	Grundschule in Teheran
1964-1973	Städt. St.Anna Gymnasium, München (Mathematisch-naturwissenschaftlicher Zweig)
Juni 1973	Abitur
WS 1973/74	Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
April 1976	Diplom-Vorprüfung
April 1978	Diplom-Hauptprüfung
Sept. 1978 - Aug. 1979	Diplomarbeit unter der Anleitung von Prof. Dr. O.Wieland am Institut für Diabetesforschung München
Sept. 1979 - Juni 1983	Doktorarbeit am selben Institut